

02 DEC 2004

EP04/11788



REC'D 09 DEC 2004	
WIPO	PCT



### Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:**

103 49 484.7

**Anmeldetag:**

21. Oktober 2003

**Anmelder/Inhaber:**

Universität Leipzig, 04109 Leipzig/DE

**Bezeichnung:**Verfahren und Bioreaktor zum Kultivieren und  
Stimulieren von dreidimensionalen, vitalen und  
mechanisch widerstandsfähigen Zelltransplantaten**IPC:**

C 12 M 3/04

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. November 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
 Im Auftrag

**Brosig**

BEST AVAILABLE COPY



## **Zusammenfassung**

**Verfahren und Bioreaktor zum Kultivieren und Stimulieren von dreidimensionalen, vitalen und mechanisch widerstandsfähigen Zelltransplantaten**

Es besteht die Aufgabe, ein Verfahren und einen Bioreaktor zur Herstellung von dreidimensionalen, vitalen und mechanisch widerstandsfähigen Zellkulturen zu schaffen, bei dem im engen zeitlichen Zusammenhang oder gleichzeitig kultiviert und stimuliert werden kann. Der Bioreaktor soll eine GMP-gerechte Transplantatkultivierung unter garantiert sterilen Bedingungen ermöglichen.

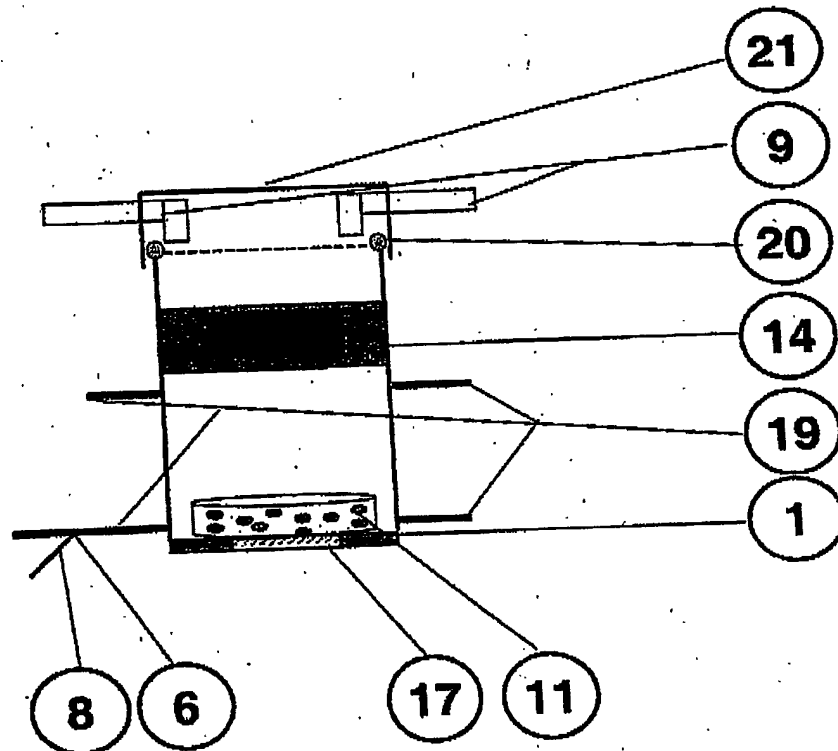
Der Bioreaktor (1) besteht aus einem Grundkörper, der mit einem Reaktorverschluss (21) druckdicht und steril verbunden ist und mindestens einen Reaktorraum bildet, in dem eine Ablagefläche für ein Transplantat (11) sowie ein Mini-Aktuator (14) implementiert sind. Weiterhin ist der Bioreaktor (1) mit wenigstens zwei Schlauchkupplungsanschlüssen (19) für die Mediumzufuhr und Mediumabfuhr bzw. zur Begasung versehen ist.

Die Erfindung ermöglicht eine GMP-gerechte Herstellung von dreidimensionalen, vitalen und mechanisch widerstandsfähigen Zellkulturen, vorzugsweise Knorpelzellkonstrukten, die hierbei in einem abgeschlossenen Mini-Bioreaktor gleichzeitig, aufeinanderfolgend oder nach einem zeitlich gesteuertem Ablauf kultiviert und stimuliert werden können. Diese so gezüchteten Transplantate stehen als Gewebeersatzmaterial zur Therapie von z.B. Binde- und Stützgewebsdefekten, direkten Gelenkstraumata, Rheumatismus und degenerativen Gelenkserkrankungen zur Verfügung und können wie z.B. bei der Kniegelenksarthrose eine Alternative zu den herkömmlichen (operativen) Therapieansätzen wie z.B. der Mikrofrakturierung bzw. der Anbohrung sein.

**Figur 3**



**Fig. 3**



- 1 -

## Beschreibung

Verfahren und Bioreaktor zum Kultivieren und Stimulieren von dreidimensionalen, vitalen und mechanisch widerstandsfähigen Zelltransplantaten

Die Erfindung betrifft Verfahren und eine Anordnung zur GMP-gerechten Herstellung von dreidimensionalen, vitalen und mechanisch widerstandsfähigen Zellkulturen, vorzugsweise Knorpelzellkonstrukten, die hierbei auf neuartige Weise in einem abgeschlossenen Mini-Bioreaktor gleichzeitig, aufeinanderfolgend oder nach einem zeitlich gesteuertem Ablauf kultiviert und stimuliert werden können. Diese so gezüchteten Transplantate stehen als Gewebeersatzmaterial zur Therapie von z.B. Binde- und Stützgewebsdefekten, direkten Gelenkstraumata, Rheumatismus und degenerativen Gelenkserkrankungen zur Verfügung und können wie z.B. bei der Kniegelenksarthrose eine Alternative zu den herkömmlichen (operativen) Therapieansätzen wie z.B. der Mikrofrakturierung bzw. der Anbohrung sein.

W Beim Tissue Engineering, das sich vor allem der in-vitro Vermehrung von körpereigenem, so genannten autologem Zellmaterial widmet, versucht man funktionelle Zell- und Gewebeersatzstrukturen zu züchten, die in einem Transplantationsschritt in das defekte Gewebe eingebracht werden können.

Hierzu werden im Labor routinemäßig Zellkulturen (z.B. Gelenksknorpelzellen) vermehrt. Die eigentliche Vermehrung dieser Zellen (z.B. Chondrozyten) erfolgt in einer Monolayerkultur auf dem Boden einer beschichteten Zellkulturflasche bzw. -schale nach Standardprotokollen, welche auch den Zusatz von gewebespezifischen Wachstumsfaktoren, Mediatoren und Induktoren beinhalten.

Das Ziel dieser additiven Faktoren ist es, beispielsweise die besondere Fähigkeit von Knorpelzellen anzuregen, ausreichende extrazelluläre Matrixkomponenten (EZM) zu synthetisieren, um bei der in-vitro Vermehrung das Massenverhältnis von 1 % Chondrozyten zu 99 % extrazellulärer Matrixbestandteile, wie es im funktionellem Gelenksknorpel gegeben ist, zu erreichen (Stockwell RA: The cell density of human articular and costal cartilage. J Anat. 1967;101(4):753-763; Hamerman D, Schubert M: Diarthrodial joints, an essay. Amer J Med. 1962;33:555-590).

- 2 -

Da dies durch die einfache Zugabe von Mediumsupplementen nicht möglich erscheint, wird versucht, diese Knorpelzellen auf unterschiedlichste Art und Weise zu Reizen bzw. zu Stimulieren, um geeigneten autologen (hyalinen) Knorpelersatz mit hohem Differenzierungsgrad im Labor anzüchten zu können.

Die beschriebene Vermehrung von Zellkulturen und Züchtung von Gewebeersatzstrukturen ist mit einer Reihe von Nachteilen verbunden.

Diese passive Kultivierung von Knorpelzellkulturen in einer zweidimensionalen Oberflächenkultur auf einer einfachen Kulturschale, welche mit Nährmedium bedeckt ist, zeigt dabei keine aktive Stimulierung der differenzierungsfähigen Knorpelzellen.

Aus Minuth, W. W., Kloth S., Aigner J., Steiner P.: MINUSHEET-Perfusionskultur: Stimulierung eines gewebetypischen Milieus. Bioscope 1995; 4:20-25 ist ein Konzept bekannt, das versucht diesen Nachteil zu umgehen, indem man das Patientenzellmaterial in eine künstliche Trägerstruktur einbringt, die dem Knorpelgewebe in seinen biophysikalischen Eigenschaften ähnelt und eine netzwerkartige Verbindung zwischen den vielschichtig angeordneten Zellen zulässt und dann eine Perfusionskultivierung in einem geeigneten Bioreaktor durchführt. Eine Vielzahl von Experimenten zeigt eine erhöhte Differenzierungsfähigkeit der Zellen durch vermehrt synthetisierter EZM an, welches auf diese dreidimensionale Kultivierung von Chondrozyten in unterschiedlichsten biokompatiblen und bioresorbierbaren Matrices, wie z.B. den Hydrogelen, Alginaten, Agarosen (Benya and Shaffer: Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell. 1982;30:215-224.) variabler Konzentrationen zurückzuführen ist.

Diese dabei erzeugte spatiale Dimension simuliert somit die originären Verhältnisse der Chondrozyten im lebenden Gewebe, wie z.B. in dem Knie- und Hüftgelenk, und stellt somit eine vorteilhafte Adaption von in-vivo Verhältnissen dar.

Bei der adhärennten Oberflächenkultivierung der Zellen gestaltet sich die ausreichende Versorgung mit Mediumsupplementen relativ einfach, da sich diese Nährstoffe unmittelbar über bzw. an den Zellen befinden und einen ungehinderten Stoffaustausch über Diffusion zulassen.

Bei der Verwendung von dreidimensionalen Matrices mit darin eingebetteten Zellen in einem statischen Kultivierungsschema hingegen kommt es zur Ausbildung von Konzentrationsgefällen bzw. -gradienten, welche den Stofftransport in mediale

- 3 -

Konstruktregionen limitieren können und somit einem optimalen Nährstoffangebot an den Zellverbänden entgegensteht.

Diese Beeinträchtigung bei der Züchtung von Zellmaterial in räumlichen Trägermatrizes wird durch die Induzierung von Mediumperfusion bzw. -transfusion durch das Konstrukt begegnet.

Dieser aktive Prozess durch diese Trägerstruktur stellt eine homogene Nährstoffversorgung an den Zellen sicher und führt zu einem stetigen Metabolitenabtransport von den Chondrozyten. Darüber hinaus kann das dynamische Kultivierungsschema einen höheren Gaseintrag gewährleisten und stimuliert so die Zellverbände in Abhängigkeit von der gewählten Mediumperfluationsströmung, durch eine dadurch hervorgerufene Scherkraft im  $\mu\text{Pa}$  mechanisch. (Raimondi, M. T., F. Boschetti, et al.: Mechanobiology of engineered cartilage cultured under a quantified fluid-dynamic environment. Biomechan Model Mechanobiol. 2002;1:69 – 82)

Ein weiterer Nachteil bei der Vermehrung von Zellen und einer Transplantatherstellung besteht in der nicht gegebenen absoluten Sterilität des Systems „Zellkulturflasche“. Selbst routinemäßige Arbeitsabläufe, wie z.B. der Medienwechsel, die Zelleinsaat aber auch die Zellernte sind mit erhöhter Infektionsgefahr für die darin befindliche Zellkultur verbunden, da das dazugehörige Kulturgefäß geöffnet werden muss und durch die Arbeit in einer Laminar Flow-Workbench keine 100%-ige Sterilität der Arbeitsumgebung im Sinne der „Grundregeln der Weltgesundheitsorganisation für die Herstellung von Arzneimitteln und die Sicherung ihrer Qualität“ (Good Manufacturing Practice – Richtlinie der WHO) garantiert werden kann.

Weiterhin ist durch dieses passive System kein maximaler Gasaustausch durch den diffusionsdurchlässigen Deckel, sowie dem Nähmedium zu dem am Boden befindlichen Zelllayer möglich.

Um diese gegebenen Nachteile der Kulturflaschen zu umgehen, wird in den letzten Jahren verstärkt die Entwicklung von automatisierten, abgeschlossenen Bioreaktorsystemen zur Generierung von Gewebeersatzstrukturen forciert. Sie können so (Freed und Vunjak-Novakovic: Microgravity tissue engineering. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1997;33:381-385) den Vorteil einer sterilen, kontrollierbaren Kultivierung und Stimulierung von dreidimensionalen Transplantaten bieten. Durch die Kombination des Tissue Engineerings mit den Möglichkeiten der Verfahrens- und Biotechnologie

- 4 -

ist die Steuerung und die Kontrolle ausgewählter Kultivierungsparameter wie z.B. der Begasung mit CO<sub>2</sub> bzw. O<sub>2</sub>, Temperaturregelung, Kulturmedienaustausch, Probenahme etc. in den Bioreaktorsystemen gegeben. (Obradovic, Carrier, Vunjak-Novakovic and Freed: Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. Biotechnol Bioeng. 1999;63:197-205).

Bei der Konstruktion von Bioreaktoren gilt es stets, ein gut durchdachtes System zu schaffen, in dem künstlich Prozesse reguliert werden können. Wenn es darum geht, ein bestimmtes Gewebe zu züchten, muss das System des Bioreaktors in der Lage sein, die physiologischen Bedingungen und Prozesse in vivo möglichst genau nachzustellen. Jedes Bioreaktorsystem wirkt mit mindestens einer Art eines mechanischen Reizes auf das gezüchtete Material.

Die Verknüpfung der positiven Eigenschaften einer gesteuerten Bioreaktorkultivierung autologer Gewebeersatzmaterialien in einer biogenen Matrix unter Perfusionsstimulierung mit Kulturmedium stellt daher die logische Konsequenz zur Gewährleistung einer automatisierten, sterilen bzw. GMP-geeigneten Transplantatkultivierung zur Züchtung von z.B. vitalen Knorpelzellen mit erhöhter EZM-Syntheseleistung dar.

Aus der DE 4306661A1 und aus Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR: Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. Biomaterials. 1994;15(6):451-456 ist ein Perfusionsreaktor bekannt, bei dem die Zellen in eine Polymerschicht eingebettet sind und zudem von einer Agarosekapsel umgeben werden. Dieser zylindrische Glasreaktor wird mit künstlichen Nährmedium, bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,016 ml/min durchströmt. Der Reaktor selbst befindet sich in einem entsprechenden Gewebebrutkasten mit standardisierten Bedingungen. Sterile Filter am Nährbodenspeicher ermöglichen einen Gasaustausch mit der äußeren Umgebung.

Weiterführende Experimente mit diesem Reaktortypen von Bujia J, Rotter N, Minuth W, Burmester G, Hammer C, Sittinger M: Cultivation of human cartilage tissue in a 3-dimensional perfusion culture chamber: characterization of collagen synthesis. Laryngorhinootologie. 1995;74(9): 559-563 und Kreklau B, Sittinger M, Mensing MB, Voigt C, Berger G, Burmester GR, Rahmzadeh R, Gross U: Tissue engineering of biphasic joint cartilage transplants. Biomaterials. 1999;20(18):1743-1749

- 5 -

verwendeten Copolymergewebe aus Vicryl- und Polydioxanonschichten, die mit Poly-L-Lysin oder kollagenen Fasern des Typs II getränkt sind. Menschliche Chondrozyten wurden in diese Schichten eingebettet und zwei Wochen lang unter Perfusion kultiviert. Unter Verwendung eines Zwei-Phasen-Modells aus einem Copolymer einer polyglycolischen Säure und einer poly-L-lactischen Säure (Ethicon), das an einem Kalzium-Carbonat-Produkt befestigt war, wurde die Zeitspanne auf 70 Tage erhöht.

Ein weiteres, dem o. g. Perfusionsbioreaktor sehr ähnliches System wurde von Mizuno S, Allemann F, Glowacki J: Effects of medium perfusion on matrix production by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges. J Biomed Mater Res. 2001;56(3):368-375 konstruiert. Im Gegensatz zum bereits beschriebenen Reaktor, besitzt dieser einen geschlossenen Bereich für das künstliche Nährmedium. Der Hauptanteil des kultivierten Materials befindet sich in einer zylindrischen Glassäule, die 1 cm breit und 10 cm lang ist. Die Säule ist mit zahlreichen Zell-/Polymergerüsten gefüllt, die jeweils eine Größe von 7 x 15 mm haben und nicht zusätzlich verkapselt sind. Das künstliche Nährmedium wird mit einer Fließgeschwindigkeit von 300  $\mu\text{l}/\text{min}$  von einem Speicher aus durch die Säule und das gesamte System geleitet. Mit Hilfe dieses Systems werden Rinderchondrozytengerüste in kollagenen Schwämmen hinsichtlich ihrer Reaktion auf Perfusion über einen Kultivierungszeitraum von 15 Tagen untersucht.

Aus dem US-Patent 5,928,945 ist ebenfalls eine Bioreaktorvorrichtung bekannt, bei der adhärenzte Knorpelzellen in einer Wachstumskammer definierten Strömungen bzw. Scherkräften ausgesetzt werden und demzufolge eine verstärkte Kollagen Typ II-Synthese detektiert wurde.

Parallel zur Entwicklung von Perfusionsbioreaktoren befassten sich Forschergruppen mit der Konstruktion von Bioreaktoren, welche diverse mechanische Belastungsvorgänge auf Explantate, Zellproben oder Zell-/Polymergerüste ausüben. Bei der Konstruktion von Bioreaktoren zur Knorpelzellstimulation richtet sich deren Aufbau auf die Implementierung von mechanischen Druckstempeln o.ä. aus, da diese uniaxialen Druck auf Knorpeltransplantate erzeugen, um die wichtigste Form der Belastung auf das menschliche Knorpelgewebe zu imitieren. Bei vielen dieser Drucksysteme werden große Ähnlichkeiten in der Konstruktion deutlich.



- 6 -

Die Druckkammer eines von Steinmeyer J, Torzilli PA, Burton-Wurster N, Lust G: A new pressure chamber to study the biosynthetic response of articular cartilage to mechanical loading. Res Exp Med (Berl). 1993;193(3):137-142 entwickelten Systems besteht aus einem Titangehäuse, das im Innern mit einer Polyethylen-Schicht bedeckt ist. Das Versuchsexemplar mit einem maximalen Durchmesser von 10 mm kann in einem Behälter am Boden der Kammer platziert und mit etwa 7 ml künstlichem Nährmedium bedeckt werden. Da das Modell kein Perfusionssystem des künstlichen Kulturmedium besitzt, sind nur schubweise Druckerzeugungen bei kurzen Kultivierungszeiten möglich. Das Lastensystem, das entsprechenden Druck auf das Versuchsexemplar ausübt, besteht aus einem durch den Kammerverschluss führenden, porösen Druckriegel und wird entweder durch einfache Gewichte oder einen Luftzylinder mit Druckkolben, der über der Kammer befestigt ist, bewegt.

Auch das von Lee DA, Bader DL: Compressive strains at physiological frequencies influence the metabolism of chondrocytes seeded in agarose. J Orthop Res. 1997;15(2):181-188 veröffentlichte System, das durch einen Antrieb in Gang gesetzt wird, ist in der Lage, auf 24 Versuchsexemplare gleichzeitig Druck auszuüben. Der Antrieb ist auf einem Rahmen, der um den Brutkasten herumführt, montiert und überträgt die Kraft hinunter zur Ladeplatte innerhalb der sterilen Box. Die Ladeplatte aus Stahl besitzt 24 Stahlbolzen mit einer Plexiglaseinkerbung von 11 mm Durchmesser. Der Antrieb sorgt für verschiedene Belastungen, die vom Grad der Verformung abhängig gemacht werden. Dieses System wird für die Kultivierung von Rinder-Chondrozyten/-Agarose-Gerüste über einen Zeitraum von zwei Tagen verwendet. Statische und zusätzliche zyklische (0,3 bis 3 Hz) Belastungen mit einer maximalen Spannungsamplitude von 15 % werden erzeugt.

Der Nachteil, einer Vielzahl von Druckstimulationsreaktoren ist, dass die Zellkulturkonstrukte während einer Druckbelastung nicht mit Nährmedium perfundiert werden können und somit nicht der Effekt einer multiplen Zellreizung untersucht werden kann. Weiterhin steht diese fehlende Nährstoffversorgung einem optimalen Stoffwechselaustausch sowie der maximalen Synthese von z.B. extrazellulären Matrixbestandteilen bei Knorpelzellen entgegen.

Druck- und Perfusionssysteme, wie sie beispielsweise in dem US-Patent 6,060,306

- 7 -

und dem DE-Patent 198 08 055 beschrieben werden, ermöglichen eine gleichzeitige Mehrfachstimulierung mit Parametern wie Perfusionsströmung, den dadurch induzierten Scherkräften und einer uniaxialen Druckbelastung.

Nachteilig bei Reaktoren die eine Druckstimulation ermöglichen ist vor allem, dass die durch Stellmotoren o.ä. angetriebenen Druckmediatoren, zumeist Stößel, Kolben u.ä. in den Bioreaktorraum, in dem sich vorzugsweise ein autologes Transplantat befindet, hereingeführt werden und dann eine definierte Druckbelastung auf das Zellkonstrukt ausüben. Durch das Einbringen dieses Druckapplikators in das sterile System gestaltet sich die Konstruktion von abgeschlossenen Druckapplikationsreaktoren äußerst schwierig, so dass diese Systeme eine erhöhte Komplexität aufweisen. Ein Einsatz dieser (potentiell unsterilen) Systeme ist deshalb nur in der Grundlagenforschung gegeben, da eine Anwendungen dieser Vorrichtungen und Verfahren im medizinischen Bereich den Richtlinien des bestehenden Arzneimittelgesetzes entgegenstehen.

Somit unterliegen sämtliche Bioreaktorapparaturen die der Züchtung, aber auch einer Stimulierung von autologen Gewebeersatzstrukturen dienen der Good Manufacturing Practice-Richtlinie der WHO („Grundregeln der Weltgesundheitsorganisation für die Herstellung von Arzneimitteln und die Sicherung ihrer Qualität“), weiterhin dem deutschen Arzneimittelgesetz (AMG), der „pharmazeutischen Inspektions-Convention“ sowie der GMP-Richtlinie 91/356/EWG. Das Risiko einer Infektion bzw. die nicht vollständig zu garantierende Sterilität der Systeme geben daher keinen Anlass zur Erteilung einer Herstellungserlaubnis nach § 13 des AMG.

A

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein Verfahren und einen Bioreaktor zur Herstellung von dreidimensionalen, vitalen und mechanisch widerstandsfähigen Zellkulturen zu schaffen, bei dem im engen zeitlichen Zusammenhang oder gleichzeitig kultiviert und stimuliert werden kann. Der Bioreaktor soll eine GMP-gerechte Transplantatkultivierung unter garantiert sterilen Bedingungen ermöglichen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das im Anspruch 1 beschriebene Verfahren und den im Anspruch 13 beschriebenen Bioreaktor gelöst. Vorteilhafte

- 8 -

Ausgestaltungen des Verfahrens werden in den Ansprüchen 2 bis 12 ausgeführt; die weitere Ausgestaltung des Bioreaktors wird in den Ansprüchen 14 bis 57 ausgeführt.

Das erfindungsgemäße Verfahren und der erfindungsgemäße Bioreaktor verbinden die Kultivierung und Stimulierung von GMP-gerecht hergestellten, dreidimensionalen, vitalen und mechanisch widerstandsfähigen Zellkulturen, vorzugsweise Knorpelzellkonstrukten in einem Reaktor. Hierbei kann die Stimulierung und Kultivierung gleichzeitig, aufeinander folgend oder nach einem zeitlich gesteuerten Ablauf durchgeführt werden. Diese so gezüchteten Transplantate stehen als Gewebeersatzmaterial zur Therapierung von z.B. Binde- und Stützgewebsdefekten, direkten Gelenkstraumata, Rheumatismus und degenerativen Gelenkserkrankungen zur Verfügung.

Das wesentlich Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens und des erfindungsgemäßen Bioreaktors ist, dass sich in einem abgeschlossenen Reaktorraum ein Transplantat befindet, welches in mehrfacher Hinsicht in-vivo-adaptiven Stimulus ausgesetzt werden kann. Dazu zählt eine Perfundierung des spatialen Zellkulturkonstruktes mit einem konditionierten Nährmedium, welches einerseits organotypische Scherkräfte an den Zellmembranen hervorruft und darüber hinaus einen erhöhten Stoffwchelsaustausch erlaubt. In diesem geschlossenen Bioreaktor befindet sich oberhalb des Transplantats ein magnetischer, kolbenähnlicher Druckstempel, der als Belastungsapplikator auf die Zellkultur fungiert. Der Stempel wird kontaktlos durch den Bioreaktorraum gesteuert und dabei eine gerichtete uniaxiale Druckstimulierung auf das Gewebetransplantat herbeigeführt. Die berührungslose Kontrolle des Mini-Aktuators erfolgt durch extern angeordnete Kontrollmagneten, deren ausgerichtetes (Elektro-)magnetisches Feld eine Positionsänderung des Stempels im Bioreaktor bewirkt und eine organotypische dynamische bzw. statische Druckstimulierung nach sich zieht.

Das Verfahren und der Bioreaktor haben den bereits aufgeführten Vorteil, dass während der Züchtung auch eine Stimulierung der Zellkulturen erfolgen kann. Es ist vor allem die Züchtung bzw. Regeneration von Binde- sowie Stützgewebsstrukturen und funktionellen Gewebesystemen (Knorpel, Knochen etc.) möglich.

Die Apparatur ermöglicht bei einer sterilen Verfahrensweise die Züchtung von

- 9 -

Zelltransplantaten die, insbesondere synchron, perfundiert und druckbelastet werden und sich demnach durch eine erhöhte Produktion von Matrixbestandteilen (z.B. Knorpelzellkulturen) auszeichnen. Aufgrund seines Automatisierungsgrades minimiert diese Vorrichtung die Zahl der Arbeitsgänge und mindert so das Infektionsrisiko der Zellkultur. Weiterhin garantiert die automatisierte Züchtung und Stimulierung der Transplantate definierte und reproduzierbare Prozessabläufe. Aufgrund der Konstruktionsmerkmale des erfindungsgemäßen Bioreaktors ist ein abgeschlossener Bioreaktorkreislauf gewährleistet und demzufolge eine streng autologe Kultivierung bzw. Stimulierung von Gewebeersatzstrukturen unter Einhaltung der GMP-Richtlinien möglich.

Für den Bioreaktor ergibt sich als weiteres Einsatzgebiet die pharmazeutische Wirkstofftestung für die Charakterisierung von proliferations- sowie differenzierungsrelevanten Stoffen bzw. Stoffkombinationen auf Transplantate.

Im Folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren und der erfindungsgemäße Bioreaktor in Ausführungsbeispielen erläutert. Die dazugehörigen Abbildungen zeigen:

- Fig. 1: Verfahren zur Herstellung von Transplantaten
- Fig. 2: Schema GMP-Bioreaktorsystem
- Fig. 3: Schema Einkammerbioreaktor
- Fig. 4: Schema Zweikammerbioreaktor
- Fig. 5: Aufbau und Ausführungsformen des Mini-Aktuators
- Fig. 6: Schema der Konstruktherstellung und Konstrukteinssaat im Bioreaktor
- Fig. 7: Schema der technischen Einrichtung zur Konstruktperfundierung und Mediendurchmischung im Einkammerbioreaktor
- Fig. 8: Schema der technischen Einrichtung zur Konstruktperfundierung und Mediendurchmischung im Zweikammerbioreaktor
- Fig. 9: Fixierungsschema des Transplantates im Bioreaktor
- Fig. 10: Magnetsysteme zur Steuerung des Mini-Aktuators
- Fig. 11: Stimulationsschema im Zweikammerreaktor

- 10 -

## Beispiel 1

### Verfahren zur Herstellung von Transplantaten

In der Figur 1 wird am Beispiel der Knorpelgewebstransplantation der Einsatz des Bioreaktors zur synchronen Kultivierung und Stimulierung von dreidimensionalen Zelltransplantaten dargestellt.

Dazu wird dem Patienten als erstes (I) gesundes Zellmaterial (z.B. artikulärer Knorpel) und Blut minimalinvasiv entnommen. Über enzymatische Verdauung werden die gewonnenen Zellen vereinzelt, ausgezählt und in Abhängigkeit davon entweder über Standardmethoden des Tissue Engineerings in Monolayerflaschen (II) ausgesät und streng autolog vermehrt oder aber sofort der Konstruktherstellung zugeführt (III). Hierbei werden die Zellen in eine dreidimensionale Transplantatsstruktur, die aus biokompatiblen bzw. -resorbierbaren Trägermaterial (z.B. Hydrogele, Agarosen, Kollagene, Hydroxylapatite, Polymerkomplexe etc.) besteht, eingebracht. Dazu werden die suspendierten Zellen (z.B. Chondrozyten) mit der biogenen Stützstruktur (z.B. Agarose) vermischt, in einem Einsaatkolben eingebracht und z.B. in einer zylindrischen Transplantatsform (z.B. Knorpel-Agarose-Matrix) ausgehärtet. Diese in-vivo adaptive, dreidimensionale Struktur führt vor allem bei Zellen des Binde- und Stützgewebes (z.B. Chondrozyten) zu einer (Re-) Differenzierung und einhergehend damit zu einer Synthese gewebstypischer Substanzen und Matrixbestandteile (z.B. Kollagene, Proteoglykane).

Dieser Einsaatkolben, mit dem innen liegenden spatialen Zelltransplantat, wird in den Bioreaktor eingeführt (IV), das Transplantat herausgepresst und im Bioreaktor positioniert. Anschließend erfolgt die GMP-geeignete entweder gleichzeitige, aufeinander folgende oder zeitlich gesteuerte Kultivierung und Stimulierung dieses Zellkonstruktes in der neu entwickelten geschlossenen Bioreaktorapparatur (V). In dieser Phase kann das Zelltransplantat mit dieser multiplen in-vivo ähnlichen Reizung (Stimuli wie Scherkraft, Perfusion, Deformation, mechanische Belastung) zu einer erhöhten Differenzierung und Expression von organotypischen Markern gebracht werden.

Nach kurzer Zeit hat sich ein hochvitaler, matrixreiches Zellkulturkonstrukt in dem Bioreaktor regeneriert. Dieses autologe Transplantat wird entnommen (VI), gegebenenfalls an die Geometrie des Gewebsdefektes angepasst und anschließend in das defekte Binde- oder Stützgewebe transplantiert.

## Beispiel 2

### Schema des Bioreaktorsystem

Figur 2 veranschaulicht eine Ausführungsform des Bioreaktorsystems (mit dem Zweikammerbioreaktor) zur autologen Kultivierung und multiplen Stimulierung von Zelltransplantaten in einer abgeschlossenen Reaktorstruktur mit GMP-gerechter Verfahrensweise.

In diesem Ausführungsbeispiel befindet sich die gesamte Vorrichtung zur Gewährleistung der optimalen Temperatur, Luftfeuchtigkeit und -zusammensetzung in einem temperierbaren und gasregulierbaren Inkubator. Ebenso ist auch ein getrennter Aufbau möglich, bei der der Bioreaktor 1 und das Medium im Inkubator und die weiteren Technikkomponenten zur Kontrolle außerhalb des Inkubators angeordnet sind.

Der Bioreaktor 1 selbst und die darin eingesetzten Bauteile sind biologisch sowie chemisch inert und autoklavierbar. Darüber hinaus besteht der Bioreaktorkorpus und der verschraubbare Deckel aus nicht- (z.B. Kunststoffe) bzw. schwach-magnetische Materialien (z.B. Vanadium-4-Stahl).

Das Kulturmedium wird aus dem Mediumreservoir 2 durch das Schlauchsystem 4 mit dem 3-Wege-Ventil 6 und dem 4-Wege-Ventil 7 mittels der Umwälzpumpe 5 in den Bioreaktor 1 geführt. Dieses Kulturmedium kann mit, aus Patientenblut gewonnenen, autologen additiven Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren, Mediatoren etc.) aus dem Supplementenreservoir 3 angereichert werden. Das Medium wird entweder im Batch, Fed-Batch oder im kontinuierlichen Verfahren dem Bioreaktor 1 und somit dem Transplantat 11 zugeführt.

Das Medium gelangt dann bei geschlossenem Kreislauf über das Schlauchsystem 4 in das Mediumreservoir 2, welches mit Messsonden zur Kontrolle der physikochemischen Parameter, wie z.B. pH,  $pCO_2$  und  $pO_2$ , ausgestattet ist. Wird das Medium als verbraucht angesehen, kann es über das Schlauchsystem 4 in ein externes, abgeriegeltes Abfallgefäß abgeleitet werden. In beiden Fällen besteht die Möglichkeit über die Ventilvorrichtung 7 eine sterile Mediumprobe aus dem Reaktorkreislauf in eine Probennahmestrecke 8 zur weiteren Analyse abzuleiten.

Im Bioreaktor 1 liegt das zu kultivierende und stimulierende Transplantat 11 in medialer Position auf dem Reaktorboden. Unterhalb des Transplantates 11 kann sich eine zweite, kleinere Kammer befinden. Dieser Strömungsraum wird über das

- 12 -

Schlauchsystem 4 mit Medium versorgt und kann mit einem stark porösen jedoch dünnen Sintermaterial 16 ausgefüllt sein. Diese untere Kammer kann durch eine dünne Klarglasscheibe 17 abgeriegelt sein und als Mikroskopieröffnung für inverse Mikroskope dienen.

Innerhalb der oberen Kammer des Bioreaktor 1 befindet sich neben den, im Bioreaktordeckel eingelassenen Biosensoren 9 der Mini-Aktuator 14. Dieser als magnetischer Stempel ausgeführte Mini-Aktuator 14 wirkt als Druckapplikator kontaktlos, und wird durch den Kontrollmagneten bzw. die Spule 15 gesteuert.

#### Beispiel 3

##### Schema Einkammerbioreaktor

Figur 3 zeigt eine mögliche Ausführungsform des Bioreaktors 1 bestehend aus einer Kulturkammer, die der Implementierung des kontaktlos steuerbaren Mini-Aktuators 14 dient.

Der als Einkammerbioreaktor ausgeführte Bioreaktor 1 besteht aus einem Korpus und dem Bioreaktorverschluss 21, der zusätzlich über einen Quetschring 20 abgedichtet ist. In der Deckelkonstruktion sind Biosensoren 9 eingelassen, die der on-line-Messung von z.B. Glukose- und Laktatkonzentrationen u.a. Mediumbestandteilen dienen. In dem Reaktorraum befindet sich ein passgenau eingelassener Mini-Aktuator 14 oberhalb des Transplantates 11, welches auf einem speziellen Reaktorboden mit eingesetzter Klarglasscheibe 17 ruht.

Zur Mediumversorgung des Transplantates 11 führen mindestens je ein Zu- und Ablauf über Luer-Anschlüsse 19 in den Bioreaktor 1. An mindestens einen der Abläufe 19 wird über ein 3-Wege-Ventil 6 eine Probennahmestrecke 8 integriert.

#### Beispiel 4

##### Schema Zweikammerbioreaktor

Figur 4 skizziert eine weitere Ausführungsform eines Bioreaktors 1 bestehend aus zwei Kammerräumen, wobei die obere den Druckstempel 14 beinhaltet und die

- 13 -

untere der Anströmung unterhalb des Transplantates 11 dient. Diese Ausführungsform unterscheidet sich in Funktion, Eigenschaft und Anforderung der Bauteile 1, 6, 8, 9, 14, 19-21 nicht von dem im Beispiel 3 beschriebenen Bioreaktor 1.

In der Apparatur sind mindestens jeweils ein Zu- und Ablauf 19 in die obere und untere Reaktorkammer eingelassen, um eine ventilierte Anströmung der jeweiligen Kammer und des Transplantates 11 zu erreichen.

Die untere Kammer ist in ihrer Dimension so gestaltet, dass ihr Durchmesser geringer als der des Transplantates 11 ist. Diese Kammer nimmt eine flache passgenaue Scheibe aus porösem Sintermaterial 16 auf, so dass eine inverse Mikroskopierung durch die abschließende Glasscheibe 17 und die Membran 18 zum Transplantat 11 unbeeinträchtigt erfolgen kann. Diese Scheibe aus gesintertem Material 16 in der unteren Reaktorkammer erfüllt in der vorliegenden Apparatur eine weitere wichtige Funktion. Sie verhindert, bei mechanischer Belastung des Transplantates 11 durch den Druckstempel 14 ein nicht erwünschtes Hereinpressen des gelartigen Zellkonstruktes 11 in den Kammerraum. In Abhängigkeit der verwendeten Stützmatrix und seiner Viskosität ist die Verwendung einer fluiddurchlässigen Membran 18 zwischen dem Sintermaterial 16 und dem Transplantat 11 vorgesehen, um eine Vermengung des Trägermaterials mit dem Sintermaterial 16 zu verhindern.

#### Beispiel 5

#### Aufbau und Ausführungsformen des Mini-Aktuators 14

Die Figuren 5 zeigen den Aufbau, die Geometrie und differierende Formen des Mini-Aktuators 14, welcher passgenau im Reaktorraum (hier exemplarisch im Zweikammermodell) vertikal gleitet und axiale Druckkräfte auf das auf dem Reaktorboden liegende Transplantat 11 überträgt.

Dieser magnetische Druckapplikator 14 wird erfindungsgemäß (siehe Fig. 5a) berührungslos durch extern angeordnete Kontrollmagneten 15 in seiner vertikalen Position im Bioreaktor 1 gesteuert. Eine absolut senkrechte Kompression kann einerseits durch die mediale Positionierung des Transplantates 11 im Bioreaktor 1 sichergestellt werden. Andererseits muss eine passgenaue Dimensionierung des Druckstempel-Außendurchmessers D2 an den Bioreaktor-Innendurchmesser D2



- 14 -

erfolgen. Dies ermöglicht eine vertikale Führung des Mini-Aktuators 14 im Bioreaktor 1, ohne ein Verkanten bzw. eine Schrägstellung des Stempels zu bewirken. Bei sämtlichen Bioreaktormodellen ist dieser Durchmesser D2 größer zu dimensionieren als der Außendurchmesser D1 des Transplantates 11.

Figur 5b stellt den charakteristischen Aufbau dieser Druckeinheit 14 dar. Er besitzt einen extrem leistungsfähigen Permanentmagneten 22, vorzugsweise aus einer Neodym-Eisen-Bor-Verbindung, der sich bereits bei geringsten magnetischen und elektromagnetischen Feldern nach der jeweiligen Feldrichtung bewegt. Dieser Permanentmagnet 22 ist in einer lackierten oder galvanisierten Form in einen biologisch inerten Kunststoff –dem Hüllkörper 23– eingekapselt. Dieser, vorzugsweise zylindrische, Hüllkörper 23 gleitet mit seinem passgenauen Außendurchmesser reibungsarm und exakt senkrecht im Bioreaktorzylinder. Auf der Unterseite des plastischen Hüllkörpers 23 können neben ebener Fläche auch andere organotypische Negativformen als Stempelfläche 24 aufgeprägt sein, um in-vivo adaptive Positivformen (u.a. Wölbungen, Bögen etc.) nachzustellen.

Die hier vorliegende neuartige Aktuatorgeometrie, ohne etwaige Strömungskanäle 33 im Hüllkörper 23, ermöglicht darüber hinaus eine Pumpfunktion bedingt durch eine zyklische Magnetfelderzeugung. Durch die bestehenden Druck- und Ventilverhältnisse im Bioreaktor 1 wird durch eine Aufwärtsbewegung des Mini-Aktuators 14 Medium in den Reaktorraum angesaugt. Durch Abwärtsbewegung bzw. Druckkompression auf das Transplantat 11 wird dieses Medium aus dem Bioreaktor 1 herausgepresst.

Figur 5c zeigt eine weitere exemplarische Ausführungsform des Mini-Aktuators 14, der ebenfalls aus einem starken Permanentmagneten 22 und einem Hüllkörper 23 mit individueller Stempelfläche 24 aufgebaut ist. Dieses Modell weist zur Strömungsoptimierung am Rand seines Hüllkörpers 23 so genannte Strömungskanäle 33 auf. Hierdurch ist eine Medienumströmung des Mini-Aktuators 14 im Bioreaktorraum möglich und es werden geringere Stellkräfte zur Überwindung des Medienwiderstandes benötigt. Der Hüllkörper 23 muss mindestens 3 Führungsnasen mit einem passgenauen Außendurchmesser D2 aufweisen, um eine planare Positionierung des gesamten Mini-Aktuators 14 auf dem Transplantat 11 sicherzustellen.

Figur 5d stellt einen modifizierten Druckstempel 14 basierend auf Figur 5b dar, welcher zur Schaffung einer räumlichen Distanz von Permanentmagneten 22 und Zellkulturkonstrukt 11 einen Verlängerungssteg 34 aufweist. Ursache dieser

- 15 -

Distanzierung des Permanentmagneten 22 in dem oberen Zylinderkopf zu dem Transplantat 11 ist die Minimierung etwaiger Feldeinflüsse auf Zellkulturen 11. Figur 5e zeigt einen Mini-Aktuator 14 basierend auf Figur 5d, welcher mindestens 3 Strömungskanäle 33 und 3 Führungsnasen mit einem Außendurchmesser D2 aufweist.

#### Beispiel 6

#### Schema der Konstruktherstellung und Konstrukteinsaat im Bioreaktor 1

Die Figuren 6 stellen das Verfahren und die Vorrichtung zur Herstellung und Einsaat von dreidimensionalen, vorzugsweise zylindrischen, Zellmatrixkonstrukten dar.

In der Figur 6a (Zellmatrixeinsaat) werden vermehrte (siehe Fig. 1, II) oder frisch isolierte (siehe Fig. 1, III) und präparierte Zellen 12 mit der biogenen Trägerstruktur 13 vermischt, bis zur Homogenität suspendiert und mit dem Zielvolumen der Zellmatrix in den Einsaatkolben 25 eingespritzt.

Der passgenaue Einsaatkolben 25 entspricht in seinem Innendurchmesser D1 dem zukünftigen Außendurchmesser des Transplantates 11 sowie in seinem Außendurchmesser D2 dem Innendurchmesser des Bioreaktor 1.

In der Figur 6b (Stempeleinsatz) ist der Stempeleinsatz 26 in dem Einsaatkolben 25 dargestellt. Während des Aushärtens bzw. des Polymerisierens der jeweiligen Zellmatrix im Reaktorkolben 25 wird auf der ebenen Schiebepatte 27 der passgenaue planare Stempel 26 mit dem Außendurchmesser D1 in den Kolbenhohlzylinder eingeführt.

Die Unterseite dieses Stempels 26 kann analog zu der Stempelfläche 24 des Mini-Aktuators 14 mit organotypischen Strukturen geprägt sein.

In der Figur 6c (Stempelaufsatz) ist der Aufsatz des Stempels 26 auf das Transplantat 11 in dem Einsaatkolben 25 aufgezeigt. Der Stempel 26 wird auf das Zellgerüst mit leichtem Anpressdruck aufgesetzt, um einer Meniskusbildung bzw. Wölbung der Matrixoberseite des Transplantates 11 entgegen zu wirken, um z.B. eine zylindrische Transplantatsform zu erhalten.

- 16 -

Soll eine In-vivo adaptive Oberfläche auf das Transplantat 11 aufgeprägt werden, so muss dieser Stempelaufsatz 26 während der Aushärte- bzw. Polymerisationsphase erfolgen.

In der Figur 6d (Entfernen der Schiebepatte) wird der aufgesetzte Stempel 26 nach der Formgebung des Transplantates 11 abgehoben und die sich am Boden des Einsaatkolbens 25 befindliche, vorzugsweise hydrophobe, Schiebepatte 27 entfernt. Um zu verhindern, dass ein gelartiges Zellkonstrukt 11 an die Schiebepatte 27 und den Einsaatkolben adhärert, wird z.B. eine inerte Folie bzw. ein inertes Polymervlies zum Auskleiden der Oberflächen verwendet.

Die Figur 6e (Konstrukteinsaat im Bioreaktor) zeigt die Einsaat eines zylindrischen Konstruktes am Beispiel des Zweikammerbioreaktors. Hierbei wird der passgenaue Einsaatkolben 25 in den Bioreaktor 1 implementiert, dann mittels Druckstempel 26 das Zellkonstrukt 11 medial in den präparierten Reaktor eingebracht und die Einsaatvorrichtung aus dem Bioreaktor 1 entfernt. Dieser präparierte Bioreaktor 1 beinhaltet das poröse Sintermaterial 16 und gegebenenfalls eine diffusionsdurchlässige Membran 18.

#### Beispiel 7

Schema der technischen Einrichtung zur Konstruktperfundierung und Mediendurchmischung im Einkammerbioreaktor

In den Figuren 7 ist die Konstruktion und der Aufbau des Einkammerreaktorkorpus und deren Auswirkung auf die Diffusion und Perfusion im Transplantat 11 dargestellt.

In der in der Figur 7a dargestellten Ausführungsform münden vier Zu- und Abläufe mit integrierter Luer-Kupplung 19 in den Bioreaktor 1. Diese können zur Strömungsoptimierung sowohl in ihrer Lage und Position differieren, also auch z.B. tangential in den Bioreaktorkorpus 1 eintreten. Die Zahl der in den Bioreaktor 1 führenden Zu- bzw. Abläufe 19 beträgt mindestens zwei. An jedem abfließend gerichteten Luer-Anschluss 19 kann mit z.B. einem 3-Wege-Ventil 6 eine Probennahmestrecke 8 installiert werden.

- 17 -

Bei einer statischen Kultivierungsweise im Bioreaktor diffundiert das Medium vor allem in die oberen und seitlichen Randbereiche des z.B. zylindrischen Gewebetransplantates 11 und versorgt die Zellkultur u.a. mit Nutrienten und führt gleichzeitig Stoffwechselendprodukte aus der Trägermatrix ab.

Die Figur 7b zeigt eine kontinuierliche Zufuhr von Nährmedium aus dem Mediumreservoir 2 mit dahinter liegendem fakultativem Supplementenreservoir 3 (nicht dargestellt) mittels einer dosierbaren Umwälzpumpe 5 durch das Schlauchsystem 4 in mindestens einen Zulauf 19 des Bioreaktors 1.

Der Abfluss des Mediums erfolgt durch mindestens einen Ablauf 19 in das Schlauchsystem 4, an dem an mindestens einer Stelle über ein 3-Wege-Ventil 6 eine abgekoppelte Probennahmestrecke 8 integriert sein kann.

Das verbrauchte Medium kann, wie hier dargestellt, im Kreislauf verbleiben, indem es in das Mediumreservoir 2 gelangt und von da aus wieder zur erneuten kontinuierlichen Perfundierung des Transplantates 11 herangezogen wird. Anderenfalls kann es aus dem Kreislauf vollständig entnommen werden. Die Kultivierung des Transplantates 11 erfolgt dann im Batch- bzw. Fed-Batch-Verfahren.

Eine gezielte kontinuierliche Zufuhr von Kulturmedium in den Reaktorraum kann die An- und Durchströmung des Transplantates 11 im Vergleich zum statischen Schema der Figur 7a deutlich verbessern. Durch die induzierte Perfundierung werden tiefere Konstrukregionen mit Medium durchgespült. Demzufolge wird der Stoffaustausch optimiert, was eine erhöhte Zelldifferenzierung nach sich ziehen kann. Weiterhin wird durch diese Ausführung der Konstruktanströmung eine Scherkraftstimulierung auf die eingebetteten Zellen ausgeübt.

#### Beispiel 8

Schema der technischen Einrichtung zur Konstruktperfundierung und Mediendurchmischung im Zweikammerbioreaktor

Die Figuren 8 zeigen einen Zweikammerbioreaktor, welcher eine optimierte Strömung, Diffusion und Perfusion des Transplantates zulässt und so die Qualität des Gewebeersatzes verbessern hilft.

- 18 -

In der Figur 8a wird eine Variante mit statischer Kultivierung und Diffusion dargestellt. Die in den Bioreaktor 1 mündenden Zu- bzw. Abläufe 19 sind mindestens zwei, wobei mindestens je einer in der unteren und oberen Reaktorkammer münden muss. Die hier aufgeführten zwei Zu- bzw. Abläufe 19 pro Kammer können zur Strömungsoptimierung sowohl in ihrer Lage, Position und Dicke differieren.

Die Probennahmestrecke 8 kann an jedem abfließend gerichteten Luer-Anschluss 19 beider Kammern mit z.B. einem 3-Wege-Ventil 6 o.ä. installiert werden.

Neben einer Mediendiffusion in die oberen und seitlichen Transplantatsbereiche führt die in dieser Konstruktion neu eingerichtete Kammer unterhalb des Transplantates 11 während der statischen Kultivierungsphase zu einer Diffusion des Kulturmediums aus dem porösen Sintermaterial in die bodennahen Regionen der Trägerstruktur, so dass daraus eine verbesserter Stoffwechsel im gesamten Transplantat 11 resultiert.

Die Figur 8b zeigt die kontinuierliche Zufuhr von Nährmedium aus dem Mediumreservoir 2 mit dahinter angeordneten fakultativen Supplementenreservoir 3 (nicht dargestellt) mittels einer dosierbaren Umwälzpumpe 5 o.ä. durch das Schlauchsystem 4 in mindestens einen Zulauf 19 der unteren und oberen Kammer des Bioreaktors 1.

Der Abfluss des Mediums erfolgt durch mindestens einen Ablauf 19 je Kammer in das Schlauchsystem 4, an dem an mindestens einer Stelle über ein 3-Wege-Ventil 6 eine abgekoppelte Probennahmestrecke 8 integriert sein kann.

Das verbrauchte Medium kann wie hier dargestellt im Kreislauf verbleiben, indem es in das Mediumreservoir 2 gelangt und von da aus wieder zur erneuten kontinuierlichen Perfundierung des Transplantates 11 herangezogen wird. Anderenfalls kann es aus dem Kreislauf vollständig entnommen werden. Die Kultivierung des Transplantates 11 erfolgt im Batch- bzw. Fed-Batch-Verfahren.

Die erfindungsgemäße Integration einer zweiten Kammer, hier unterhalb des Transplantates 11, zeigt seine positiven Eigenschaften vor allem bei einer gezielten Anströmung des biologischen Konstruktes auf. Wird demzufolge mittels des 3-Wege-Ventils 6 der Medienstrom aus dem Mediumreservoir 2 in die untere Kammer geschaltet, erfolgt eine induzierte aufwärtsgerichtete Perfundierung des Transplantates 11 bei geschlossenem unteren Ablauf, da das Medium den Reaktorraum nur durch den oberen Ablauf verlassen kann.

- 19 -

Analog zu diesem Schema lässt sich durch eine Umschaltung der 3-Wege-Ventile 6 eine Transplantatsdurchströmung von der oberen zur unteren Kammer durch das Konstrukt 11 erwirken. Resultat dieser aufgezeigten Vorrichtung ist neben der vollständigen Perfundierung eine weitere Zellstimulation über eine induzierte Scherkraft, die auf die Zellen wirkt und über den Volumenstrom der Umwälzpumpe 5 eingestellt werden kann. Möglich ist auch eine partielle bzw. totale Öffnung der 3-Wege-Ventile 6, um einen schnelleren Mediaustausch im Bioreaktor 1 zu erzielen.

#### Beispiel 9

##### Fixierungsschema des Transplantates 11 im Bioreaktor 1

Die Figuren 9 zeigen das Fixierungsschema des Transplantates 11 im Bioreaktor 1 entweder in der Einkammer- oder Zweikammerausführung.

Die Figur 9a zeigt das zu stimulierende Transplantat 11, das medial oberhalb des Klarglases 17 im Einkammerbioreaktor 1 fixiert ist. Mit mindestens 3 dieser Fixierwände 28 soll eine durch einströmendes Medium hervorgerufene, horizontale Bewegung des Transplantates 11 am Reaktorboden verhindert werden, um eine optimale Perfusion und Druckstimulation durchführen zu können. Diese im Reaktor 1 eingelassenen, biokompatiblen Fixierwände 28 müssen in ihrer Höhe unterhalb der zu applizierenden Druckamplitude auf das Transplantat 11 dimensioniert werden.

In der Figur 9b ist der Einsatz von mindestens 3 dieser Fixierwände 28 im Zweikammerbioreaktor skizziert, um eine horizontale Fixierung des Transplantats 11 bei den verschiedenen Strömungsverhältnissen zu erreichen und eine ideale senkrechte Perfundierung sowie eine mechanische Druckbeaufschlagung zu ermöglichen.

#### Beispiel 10

##### Magnetsysteme zur Steuerung des Mini-Aktuators 14

Die Figuren 10 stellen (dargestellt am Einkammerbioreaktor) charakteristische

- 20 -

Vorrichtungen und Apparaturanordnungen für das kontaktlos steuerbare Stimulationsverfahren des Mini-Aktuators 14 auf das Transplantat 11 dar.

In der Figur 10a (Magnetischer Steuerungseffekt – Magnetanziehung) sind die charakteristische Vorrichtung und das Prinzip zur berührungslosen Kontrolle des magnetischen Mini-Aktuators 14 im Bioreaktor 1 zur Druckdeformation des Transplantates 11 aufgeführt. Die Ausrichtung der Permanentmagneten im Mini-Aktuator 14 erfolgt nach der vorherrschenden Magnetfeldrichtung, die durch extern angeordneten Kontrollmagneten 15 erzeugt wird. Durch diesen Kontrollmagneten 15, der z.B. mindestens ein Permanentmagnet oder mindestens eine Spule ist, wird ein definiertes (elektro-)magnetisches Feld generiert, welches mit seinen Feldlinien in den gesamten Bioreaktorraum 1 herein reicht und eine feldrichtungsabhängige Bewegung des Druckstempels des Mini-Aktuators 14 auslöst. In dem Beispiel der Figur 10a wird durch den, hier exemplarisch oberhalb angeordneten, Kontrollmagneten 15 das Prinzip der Magnetanziehung aufgezeigt.

In dem In der Figur 10b (Magnetischer Steuerungseffekt – Magnetabstoßung) dargestellten Ausführungsbeispiel wird durch die Magnetabstoßung der zweite magnetische Steuerungseffekt zwischen dem magnetischen Kontrollsystems 15 und dem Mini-Aktuator 14 dargestellt. Durch einen Wechsel der Magnetfeldrichtung des Kontrollmagneten 15 ändert sich die Bewegungsrichtung des Mini-Aktuators 14, welcher nun abwärtsgerichtet auf das Transplantat 11 gesteuert wird. Durch Erhöhung der Leistung bzw. magnetische Flussdichte ausgehend vom Kontrollmagneten 15 verstärkt sich auch die Druckbelastung des Transplantates 11 bis zum Zielwert der in-vivo adaptiven Stimulation.

Die Figuren 10c-10e zeigen Anordnungen von Steuerungselementen, mit denen es möglich ist, den Mini-Aktuator 14 zyklisch und mit hoher Frequenz in einem abgeschlossenen Bioreaktor 1 zu steuern.

Die Figur 10c (Steuerung des Mini-Aktuators 14 mittels einer Kontrollmagnetführungsplatte) stellt eine Ausführungsform eines permanentmagnetischen Steuerungssystems dar. In dieser Magnetfeldvariante arbeitet eine Anordnung von mehreren Permanentmagneten 32 unterschiedlicher Größe, Polung und somit Feldstärke sowie -richtung auf einer linear gesteuerten Führungsplatte 31, die hier beispielhaft oberhalb des Reaktorprototyps positioniert ist.

- 21 -

Hierbei wird durch einen Linearmotor 29 eine Führungsschiene 30 mit den in der Magnethalterung 31 eingesetzten Permanentmagneten 32 angetrieben. Diese mobile Phase des Magnetsystems macht eine Bewegung des Bioreaktors 1 unnötig.

Das Steuerungssystem in Figur 10d (Steuerung des Mini-Aktuators 14 mittels rotierenden Permanentmagneten) basiert ebenfalls auf einer Steuerung des magnetischen Druckstempels 14 mittels einer Dauermagnetenanordnung auf einer rotierenden Scheibe.

Hierbei treibt ein Stellmotor 29 eine Magnethalterung 31 mit eingepassten Permanentmagneten 32 alternierender Polungen in rotierender Weise an. Diese rotierende Magnethalterung kann beispielsweise mit vier alternierend gepolten Magneten 32 besetzt sein und bewirkt infolge dessen bei einer vollen Umdrehung zwei komplette Druckbeaufschlagungen auf das Transplantat 11. Die Kombination dieser Magnetbesetzung der Rotationsscheibe mit der Umdrehungsgeschwindigkeit des Stellmotors 29 ergibt eine höher frequente Magnetfeldänderung und demzufolge ein hochdynamisches Stimulationsschema auf das Transplantat 11. Die Vorderansicht verdeutlicht beide Magneteffekte des Rotationssystems anhand zweier Bioreaktoren 1. Die Ausführungsform dieser Vorrichtung ist für eine Vielzahl von Bioreaktoren 1 geeignet, solange diese exakt ober- bzw. unterhalb des Kontrollmagnetmittelpunktes platziert werden können.

Die Figur 10e (Steuerung des Mini-Aktuators 14 mittels Eisenkernspule 35) stellt eine Magnetvorrichtung basierend auf einer Spulenanordnung dar.

Dieses Magnetpulensystem arbeitet mit einer Induktionsspule 35, die hier oberhalb des Bioreaktors 1 fixiert wird, unter Erzeugung eines definierten Elektromagnetfeldes, welches sich über die zugeführte elektrische Leistung stufenlos regeln lässt und somit jegliche Positionen des Mini-Aktuators 14 im Bioreaktorkorpus ermöglicht. Durch eine Umpolung der Stromrichtung erfolgt eine Umkehrung der vorhandenen Feldrichtung und des elektromagnetischen Effektes. Die verwendete Eisenkernspule 35 baut senkrecht zur Spulenwicklung ihr elektrisches Feld auf und wirkt auf den statischen Permanentmagneten des Mini-Aktuators 14 anziehend sowie abstoßend ein.

Eine automatisierte Station dieses Systems besteht aus einer leistungsfähigen Spule 35 mit geringer Wärmeentwicklung mit einem angeschlossenen regulierbaren



- 22 -

Transformator, dessen Leistung mittels eines Multimetermessgerätes überwacht wird. Darüber hinaus gewährleistet der Einsatz einer Mikrocontrollers die Ansteuerung eines Relais, welches den Strom in gewünschter Richtung schaltet, den gewünschten Effekt einer intermittierenden Druckapplizierung auf das Zellkonstrukt.

#### Beispiel 11

##### Stimulationsschema im Zweikammerreaktor

Die Figuren 11 zeigen das gesamte Stimulationsschema des neuartigen GMP-fähigen Bioreaktors 1. Hierbei laufen die mechanische Druckstimulation, die Perfusion und die scherkraftinduzierte Strömung in dem dreidimensionalen Transplantat 11 parallel ab.

In der Figur 11a (Perfusionsstimulierung ohne mechanische Belastung) erfolgt eine Stimulierung des Zellkonstruktes 11 nur über eine gerichtete Medienanströmung, die zu einer Konstruktperfundierung mit einer Scherkraftausübung auf die Zellmembran im  $\mu\text{Pa}$ -Bereich führt. Dargestellt ist in diesem Verfahrensbeispiel eine kontinuierliche Nährmedienzufuhr in zwei Zulaufe 19, so dass jede Reaktorkammer versorgt wird, sich zuerst ein Konzentrationsausgleich im Transplantat 11 einstellt und hiernach, in Abhängigkeit der gewählten Volumenströme, sich eine obere- und untere Perfusionszone im Konstrukt ausbildet. Dieses verbrauchte Medium verlässt über zwei weitere Abläufe 19 den Reaktorraum. Während dieser Strömungsstimulierung erfolgt hier keine Druckbeaufschlagung, da der Druckstempel 14 vom Kontrollmagnetsystem 15 in eine obere Position im Bioreaktor 1 gehalten wird.

In der Figur 11b (Perfusionsstimulierung und Stempelaufsatz) ist der zweite Schritt einer multiplen Stimulierung von Gewebeersatzmaterialien 11 in dem Bioreaktor 1 aufgezeigt. Zuerst werden, wie in diesem Beispiel, die Strömungsverhältnisse modifiziert. Über die 3-Wege-Ventile 6 wird der Nährmedienstrom nur in die untere Reaktorkammer geleitet, von wo es durch das Transplantat 11 perfundiert, den Stoffaustausch herbeiführt und den oberen Reaktorraum über ein Abfluss verlassen kann. Durch eine Umpolung des Kontrollmagnetsystems, hier einer Eisenkernspule 35 bei geringer Leistungsinduktion, kommt es zum Aufsatz des magnetischen Mini-Aktuators 14 auf den z.B. zylindrischen Gewebeersatz 11. Dieser Stempelaufsatz mit

- 23 -

einer 0%-igen Konstruktdeformation markiert einen Umkehrpunkt des Mini-Aktuators 14 bei einer dynamischen hochfrequenten Deformation der Zellmatrix 11.

Im nächsten Schritt des Stimulationsverfahrens wird, wie in Figur 11c (Perfusionsstimulierung und mechanische Belastung) dargestellt, die von der Spule 35 ausgehende Magnetfeldstärke erhöht. Das Resultat dieser erhöhten magnetischen Flussdichte ist eine verstärkte Kompression des Transplantates 11 auf die gewünschte Zieldeformation, die vorzugsweise in-vivo-ähnliche Prozesse imitiert. Nach dieser erfolgten Druckstimulation kann in intermittierender Verfahrensweise ein Wechsel zwischen Zellreizung und Stempelaufsatzes herbeigeführt werden.

Auch eine statische Kompression des Ersatzmaterials ist mit dem aufgeführten Apparat und dem dargelegten Verfahren möglich.

Grundsätzlich kann während dieser mechanischen Belastung eine gerichtete Konstruktperfusion durch die Trägermatrix eingeführt werden, welche den Zellen benötigte Nutrienten liefert und Metaboliten abführt, die vor allem während stoffwechselaktiver Phasen, wie z.B. bei der Proliferation und der Differenzierung (extrazelluläre Matrixsynthese), ausgetauscht werden.

Nachdem das Druckbelastungsprotokoll abgearbeitet wurde, führt man die Stempelvorrichtung in den Ausgangszustand zurück, perfundiert die Zellkultur z.B. weiter kontinuierlich und entnimmt, z.B. bei ausreichend synthetisierter extrazellulärer Matrix, das Transplantat 11.

### Liste der Bezugszeichen

- 1 Bioreaktor
- 2 Mediumreservoir
- 3 Supplementenreservoir
- 4 Schlauchsystem
- 5 Umwälzpumpe
- 6 3-Wege-Ventil
- 7 4-Wege-Ventil
- 8 Probenentnahmestrecke
- 9 Biosensoren Glu/Lac
- 10 Messsonden pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>
- 11 Transplantat
- 12 Zellen/Gewebe
- 13 Stützmatrix
- 14 Mini-Aktuator
- 15 Kontrollmagnet
- 16 poröses Sintermaterial
- 17 Klarglas
- 18 Durchlässige Membran
- 19 Schlauchkupplung/Luer-Anschluss
- 20 Quetschring
- 21 Reaktorverschluss
- 22 Permanentmagnet
- 23 Hüllkörper
- 24 Stempelfläche
- 25 Einsaatkolben
- 26 Stempel
- 27 Schiebeplatte
- 28 Fixierwand
- 29 Stellmotor
- 30 Führungsschiene
- 31 Magnethalterung
- 32 Permanentmagnet
- 33 Strömungskanäle
- 34 Verlängerungssteg
- 35 Spule

- 1 -

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Kultivieren und Stimulieren von dreidimensionalen, vitalen und mechanisch widerstandsfähigen Zelltransplantaten in einem GMP-geeigneten Bioreaktor, mit den Verfahrensschritten
  - a) das dem Organismus entnommene, mit an sich bekannten Methoden zur Bioreaktorkultivierung aufbereitete Explantatzellen (12) und aus handelsüblichen biokompatiblen, -resorbierbaren oder autologen oder homologen Materialien bestehende Trägermatrizes (13) nach deren Mischung als Zellmatrixsuspension
  - b) in einen, gegebenenfalls folierten, Einsaatkolben (25) mit beliebigen, dem späteren Transplantat angepassten Querschnitt eingebracht wird und dort aushärtet bzw. polymerisiert,
  - c) gegebenenfalls hierbei mittels eines passgenauen, inerten, gegebenenfalls strukturierten oder folierten Stempels (26) mit minimalen Druck belastet wird,
  - d) der Einsaatkolben mit dem Transplantat (11) in den Kammerraum des Bioreaktorkorpus eingeführt wird,
  - e) wo das Transplantat (11) aus dem Einsaatkolben (25) auf dem Bioreaktorboden medial aufgebracht und der Bioreaktor (1) nach Entfernung des Einsaatkolbens verschlossen wird,
  - f) wo das Transplantat durch den Eintrag von Perfusionsströmung weiter kultiviert wird und
  - g) nach Abschluss der Kultivierung das Gewebeersatzmaterial zur weiteren Verwendung entnommen wird,

dadurch gekennzeichnet, dass das Transplantat in der Phase der Kultivierung auf der dem Bioreaktorboden gegenüberliegenden Oberfläche durch Druck belastet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Transplantat durch einen den Druck vermittelnden Stempel belastet wird.

- 2 -

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass sowohl die Durchmischung des Bioreaktorraumes durch den Eintrag von Perfusionsströmung als auch der einen Druck auf das Transplantat vermittelnden Stempel in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen zeitlich und in der Menge bzw. Stärke steuerbar sind.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Transplantat intervallartig mit konditionierten Nährmedium durchströmt wird und zyklisch mit dem Druck vermittelnden Stempel belastet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Druckbelastung des Transplantates während der Perfundierung erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Transplantat in Abhängigkeit von der Verwendung mit statischen, vorzugsweise mit in-vivo-ähnlichen Druckbelastungen bzw. Konstruktdeformationen gereizt wird oder kontinuierlich mit intermittierenden bzw. dynamischen Druckkräften belastet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die mechanischen Belastungen mit einer Frequenz von mehr als 0,1 Hz erfolgen.
8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die mechanische Druckstimulierung die Form einer symmetrischen oder unsymmetrischen Cosinus- oder Sinushalbwellen aufweist.
9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der aus einem magnetischen Material bestehende Druckstempel durch ein außerhalb des Bioreaktors erzeugtes (elektro-) magnetisches Feld längs zur Oberfläche des Transplantates im Bioreaktor bewegt wird.

- 3 -

10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das magnetische Feld durch mindestens einen Permanentmagneten erzeugt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass sich mindestens zwei Permanentmagneten mit alternierender Polung auf einer mobilen Halterung oberhalb des Bioreaktors angeordnet sind und zyklisch von einem Stellmotor angetrieben, ihre Position wechseln, wodurch der Druckstempel alternierend auf das Transplantat drückt.
12. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Spule eines Elektromagneten hochfrequent ihre Stromrichtung und Spannung und somit Feldrichtung und magnetische Flussdichte über den Bioreaktor ändert, wodurch der Druckstempel alternierend auf das Transplantat drückt.
13. Bioreaktor zum Kultivieren und Stimulieren von dreidimensionalen, vitalen und mechanisch widerstandsfähigen Zelltransplantaten in einem GMP-geeigneten Bioreaktor,  
dadurch gekennzeichnet, dass der Bioreaktor (1) aus einem Grundkörper mit einem Reaktorverschluss (21) druckdicht und steril verbunden ist und mindestens einen Reaktorraum bildet, in dem eine Ablagefläche für ein Transplantat (11) sowie ein Mini-Aktuator (14) implementiert und der Bioreaktor (1) mit wenigstens zwei Schlauchkupplungsanschlüssen (19) für die Mediumzufuhr und Mediumabfuhr bzw. zur Begasung versehen ist.
14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkulturkonstrukte (11) direkt oder indirekt auf dem Bioreaktorboden eines Einkammerbioreaktors (1) kultivierbar und stimulierbar sind.
15. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellkulturkonstrukte (11) direkt oder indirekt, zumindest partiell, auf einer Bodenfläche der oberen Reaktionskammer eines Zweikammerbioreaktors zur

- 4 -

Züchtung und Stimulierung liegt, während sich unterhalb dieses Transplantates (11) ein zweiter Reaktorraum befindet.

16. Vorrichtung nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Bioreaktor (1) mit einem Transplantatseinsatz auf dem Boden der oberen Reaktorkammer versehen ist, in den die Zellkonstrukte (11) einlegbar sind.
17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter des Bioreaktors (1) einen hohlzylinderförmigen Korpus aufweist, der auf der Oberseite von einem Reaktorverschluss (21) abgeschlossen ist.
18. Vorrichtung nach Anspruch 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass der oder die Reaktorverschlusseinheit (21) und der Bioreaktor (1) durch eine Gewindeverbindung und wenigstens einem Dichtring (20) miteinander dergestalt verbunden sind, dass entweder die Gewindeverbindung zwischen dem Reaktorverschluss (21) und dem Behälter (1) durch ein Innengewinde in dem Behälter (1) und ein damit zusammenarbeitendes Außengewinde in dem Reaktorverschluss (21) oder die Gewindeverbindung zwischen dem Reaktorverschluss (21) und dem Behälter (1) durch ein Außengewinde in dem Behälter (1) und ein damit zusammenarbeitendes Innengewinde in dem Reaktorverschluss (21) hergestellt ist.
19. Vorrichtung nach Anspruch 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der als Deckel ausgeführte Reaktorverschluss (21) mit Biosensoren (9) und/oder Messsonden (10) versehen ist.
20. Vorrichtung nach Anspruch 13 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Deckel (21) mit einer Probennahmestrecke (10) versehen ist.
21. Vorrichtung nach Ansprüche 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Grundkörper des Bioreaktors (13) in der Ausführung als Einkammer-

- 5 -

bioreaktor mit mindestens je einer Zu- und Ablaufbohrung für die Einrichtung von Schlauchkupplungsanschlüssen (19) versehen ist.

22. Vorrichtung nach Ansprüchen 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Grundkörper des Bioreaktors (1) in der Ausführung als Zweikammerbioreaktor mit mindestens zwei Bohrungen für die Einrichtung von Schlauchkupplungsanschlüssen (19) versehen ist.
23. Vorrichtung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass im Zweikammerbioreaktor mindestens je ein Schlauchkupplungsanschluss (19) in den unteren und oberen Reaktionsraum eingelassen ist.
24. Vorrichtung nach Anspruch 21 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die in die Bioreaktorkammern mündenden Zulaufanschlüsse (19) und Ablaufanschlüsse (19) mit einem 3-Wege-Ventil (6) oder mit einem 4-Wege-Ventil (7) mit Rückschlagsfunktion versehen sind.
25. Vorrichtung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass an mindestens einer der Ablaufanschlüsse (19) mit einer Probennahmestrecke (10) versehen sind.
26. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass zur Überwachung der Transplantatherstellung der Bioreaktor (1) am Reaktorboden vollständig oder teilweise aus einem transparenten Material, vorzugsweise einer Klarglasscheibe (17) besteht.
27. Vorrichtung nach Anspruch 13 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass über dem Reaktorboden des Bioreaktors (1) eine Folie, Vlies oder Membrane (18) aus einem antistatischen oder inerten Material zur Auflage des Transplantates (11) angeordnet ist und dieses Material vorzugsweise weitmaschig, licht-, fluid- und gasdurchlässig ist.
28. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass die obere Reaktorkammer des Bioreaktors (1) bei



- 6 -

Ausführung als Zweikammerreaktor in ihrer Grundfläche der Transplantatsgrundfläche entspricht, während die Abmaße der unteren Kammer unter denen des Transplantates (11) liegen, so dass bei einer mediale Zellkulturaufgabe dieses Konstrukt größtenteils über der unteren Kammer liegt und teilweise auf dem Reaktorboden der oberen Kammer.

29. Vorrichtung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass den Raum der unteren Reaktorkammer eine flache Scheibe (16) aus biologisch inertem, lichtdurchlässigem, weitporigem Material ausfüllt, vorzugsweise aus porösem Sintermaterial, so dass ein ebener Reaktorbodenabschluss aus dieser Scheibe (16) und dem Boden der oberen Reaktorkammer gebildet wird.
30. Vorrichtung nach Anspruch 28 und 29, dadurch gekennzeichnet, dass oberhalb der durch die Scheibe (16) ausgefüllten unteren Reaktorkammer auf dem sich in der oberen Reaktorkammer bildenden Reaktorboden des Zweikammerbioreaktors (1) eine Folie, Vlies oder Membrane (18) aus einem antistatischen oder inerten Material zur Auflage des Transplantates (11) angeordnet ist und dieses Material vorzugsweise weitmaschig, licht-, fluid- und gasdurchlässig ist.
31. Vorrichtung nach Anspruch 28 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Komponenten, welche sich im Zweikammerbioreaktor (1) unterhalb des Transplantates (11) befinden, wie die transparente Scheibe (17), die untere Kammer mit eingelegtem porösen Material (16) und eine weitmaschige Membrane (18), eine Gesamthöhe innerhalb der Brennweite von handelsüblichen Mikroskop- und Kameraobjektiven nicht überschreiten.
32. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein magnetischer, vorzugsweise kolbenähnlicher, Mini-Aktuator (14) in dem Bioreaktor (1) angeordnet ist, der von einem oder mehreren extern angeordneten Kontroll- und Steuermagneten (15) durch den Bioreaktor (1) gesteuert bewegt wird.

33. Vorrichtung nach Anspruch 13 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass der Mini-Aktuator (14) im Einkammerbioreaktor (1) oberhalb der Membran (18) und dem Transplantat (11) im Bioreaktorraum angeordnet ist.
34. Vorrichtung nach Anspruch 13 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass der Mini-Aktuator (14) im Zweikammerbioreaktor (1) oberhalb des porösen Materials (16), der Membran (18) und dem Transplantat (11) in dem oberen Reaktorraum angeordnet ist.
35. Vorrichtung nach den Ansprüchen 32 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass der zu implementierende magnetische Mini-Aktuator (14) aus einem magnetischen Kernkörper (22), vorzugsweise aus einem Permanentmagneten, aufgebaut ist, der in einem biologisch inertem Hüllkörper (23), vorzugsweise Kunststoff, eingekapselt ist.
36. Vorrichtung nach Anspruch 32 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass der magnetische Kernkörper (22) so ausgerichtet ist, dass das sich zwischen den Polen ausbildende Feld senkrecht zum Transplantat (11) verläuft, so dass der magnetische Nordpol des gesamten Mini-Aktuators (14) aufwärts ausgerichtet ist.
37. Vorrichtung nach Anspruch 32 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass der den Kernmagneten (22) umgebende biokompatible Hüllkörper (23) in seiner äußeren Form der Querschnittsform der Reaktorkammer des Bioreaktors (1) entspricht.
38. Vorrichtung nach Anspruch 32 bis 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Gesamthöhe des Hüllkörpers (23) so gewählt ist, dass es bei einer Implementierung des Mini-Aktuators (14) in den Reaktorraum zu einer senkrecht ausgerichteten Führung des Druckstempels des Mini-Aktuators (14) auf das Transplantat (11) kommt.
39. Vorrichtung nach Anspruch 32 bis 38, dadurch gekennzeichnet, dass der kolbenförmige Mini-Aktuator (14) aus mehr als einem Hüllkörper-

- 8 -

zylinder besteht, so dass ein Hüllkörperzylinder, vorzugsweise der obere, den eingekapselten Permanentmagneten beinhaltet und ein weiterer Zylinder der Stempelaufprägung (24) dient, wobei die räumlich getrennten Zylinder über einen Steg (34) oder eine funktionsgleiche Verbindung miteinander verbunden sind.

40. Vorrichtung nach Anspruch 32 bis 39, dadurch gekennzeichnet, dass die durch den Hüllkörper (23) gebildete planare Stempelfläche (24) an der Unterseite des Mini-Aktuators (14) senkrecht zu der Führungsrichtung im Bioreaktorraum (1) verläuft.
41. Vorrichtung nach Anspruch 32 und 40, dadurch gekennzeichnet, dass auf die Stempelfläche (24) des Mini-Aktuators (14) organotypische Negativformen, wie z.B. eine Wölbung, aufgeprägt sind.
42. Vorrichtung nach Anspruch 32 und 41, dadurch gekennzeichnet, dass die planare oder geformte Stempelfläche (24) eine Prägung in Form einer Gitterstruktur zur Vergrößerung der Stempeloberfläche aufweist, vorzugsweise mit kleinmaschiger Struktur.
43. Vorrichtung nach Anspruch 32 bis 42, dadurch gekennzeichnet, dass der Hüllkörper (24) des Mini-Aktuators (14) mit Bohrungen und/oder Strömungskanälen (33) so versehen ist, dass über mindestens 3 Stellen des Außendurchmessers eine passgenaue, vertikale Führung des Mini-Aktuators (14) weiter gewährleistet ist.
44. Vorrichtung nach Anspruch 32 bis 43, dadurch gekennzeichnet, dass die Stempelfläche (24) des Mini-Aktuators (14) mit mindestens einer Führungsnase versehen ist, welche in ihrer passgenau eingelassenen Führungsschiene im Bioreaktorkorpus vertikal gleitet.
45. Vorrichtung nach Anspruch 32 bis 44, dadurch gekennzeichnet, dass der außerhalb des Bioreaktors (1) angeordneter Kontroll- und Steuerungsmagnet (15) mit dem von ihm ausgehenden (elektro-)magnetischen Feld eine

gerichtete Bewegung des implementierten Mini-Aktuators (14), mit seinem nach oben ausgerichteten magnetischen Nordpol des Permanentmagneten (22), hervorruft.

46. Vorrichtung nach Anspruch 32 bis 45, dadurch gekennzeichnet, dass der Kontroll- und Steuerungsmagnet (15) in einer senkrechten Achse zum Druckstempel (14) medial, vorzugsweise oberhalb des Druckstempels (14), angeordnet ist und in Abhängigkeit von der Polung den Mini-Aktuator (14) auf und ab bewegt, woraus eine Veränderung des Druckes auf das Transplantat (11) folgt.
47. Vorrichtung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass der Kontroll- und Steuermagnet (15) aus mindestens zwei Permanentmagneten (32) mit unterschiedlicher senkrechter Magnetpolrichtung besteht, die in eine quaderförmige Magnethalterung (31) eingesetzt sind und durch einen Stellmotor (29) und einer Führungsschiene (30) über den Bioreaktor (1) zyklisch in ihrer horizontalen Position versetzt werden.
48. Vorrichtung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass der Kontroll- und Steuermagnet (15) aus mindestens zwei Permanentmagneten (32) mit unterschiedlicher senkrechter Magnetpolrichtung besteht, die in eine scheibenförmige Magnethalterung (31) eingesetzt sind und durch den Rotationsantrieb eines Stellmotors (29) zyklisch über den Bioreaktor (1) hinweggeführt werden.
49. Vorrichtung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die in ihrer horizontalen Position fest fixierten Bioreaktoren über eine vertikale Bewegung an die Magnethalterung (31) mit den Permanentmagneten (32) mittels Schrittmotor herangeführt werden, um den jeweiligen Feldeffekt zu steigern und höhere Druckkräfte auf das Transplantat (11) zu generieren.
50. Vorrichtung nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei Bioreaktoren (11) in einer Station so angeordnet werden, dass

- 10 -

ihre Mini-Aktuatoren (14) von nur einem permanentmagnetischen Kontrollsystem kontaktlos angetrieben werden.

51. Vorrichtung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass der Kontroll- und Steuermagnet (15) als Elektromagnet mit mindestens einer Induktionsspule (35) ausgeführt ist, deren Feld mit an sich bekannten Mitteln stufenlos regelbar ist.
52. Vorrichtung nach Anspruch 32 und 51, dadurch gekennzeichnet, dass die Induktionsspule (35) hochfrequent mit veränderbarer Frequenz angesteuert wird, um hochdynamische Magnetfeldänderungen und Bewegungen des Mini-Aktuators (14) auf das Transplantat (11) hervorzurufen.
53. Vorrichtung nach Anspruch 13 bis 52, dadurch gekennzeichnet, dass ein, vorzugsweise zylindrischer, Einsaatkolben (25) mit einem Innendurchmesser, der dem Außendurchmesser des Transplantates entspricht, vorgesehen ist zum Einspritzen der Zellen (12) und der Trägermatrix (13) auf eine bewegliche Schiebeplatte (27).
54. Vorrichtung nach Anspruch 13 bis 53, dadurch gekennzeichnet, dass die bewegliche Schiebeplatte (27) und der Innenraum des Einsaatkolbens (25) mit einer inerten Membrane, Folie bzw. Polymervlies überzogen sind.
55. Vorrichtung nach Anspruch 53 und 54, dadurch gekennzeichnet, dass in den Einsaatkolben (25) ein passgenauer Stempel (26) mit einer planaren Stempelfläche oder einer organotypischen Negativform leicht auf die Zellsuspension aufgesetzt ist.
56. Vorrichtung nach Anspruch 53 bis 55, dadurch gekennzeichnet, dass der Außendurchmesser des Einsaatkolbens (25) passgenau dem Innendurchmesser des Bioreaktors (1) entspricht.
57. Vorrichtung nach Anspruch 13 bis 56, dadurch gekennzeichnet, dass am Reaktorboden des Bioreaktors (1) mindestens 3 Fixierwände (28)

- 11 -

eingelassen sind, die in ihren Abmaßen einer Transplantatseinlage entgegen kommen und die Druckkompression nicht behindern.

Fig. 1

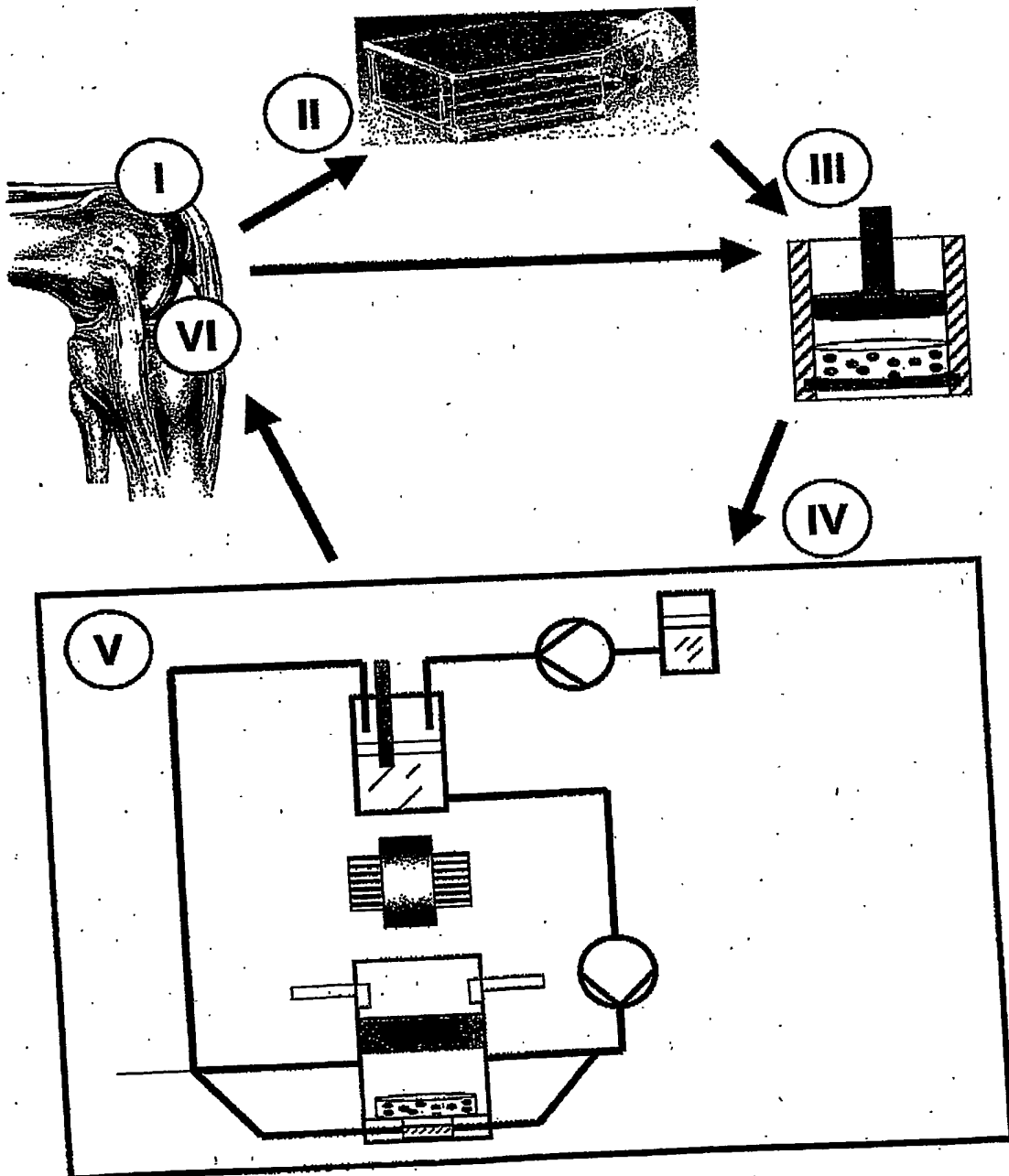
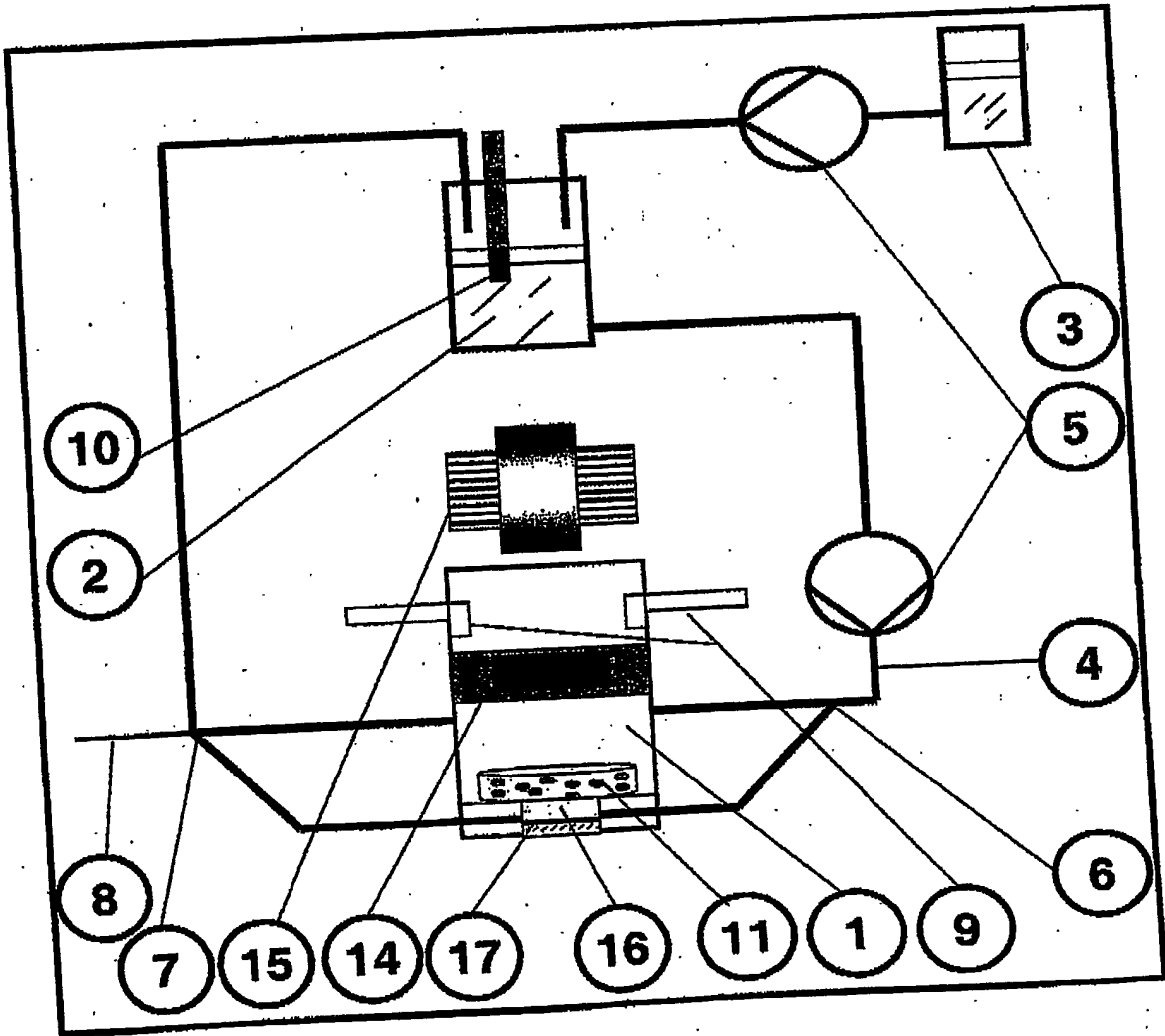


Fig. 2





**Fig. 3**

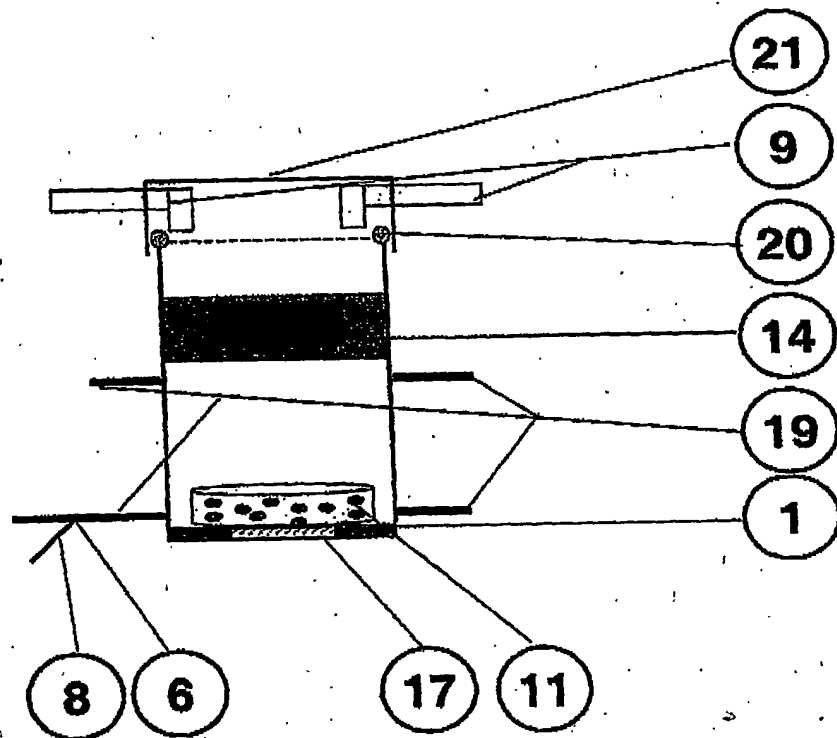


Fig. 4

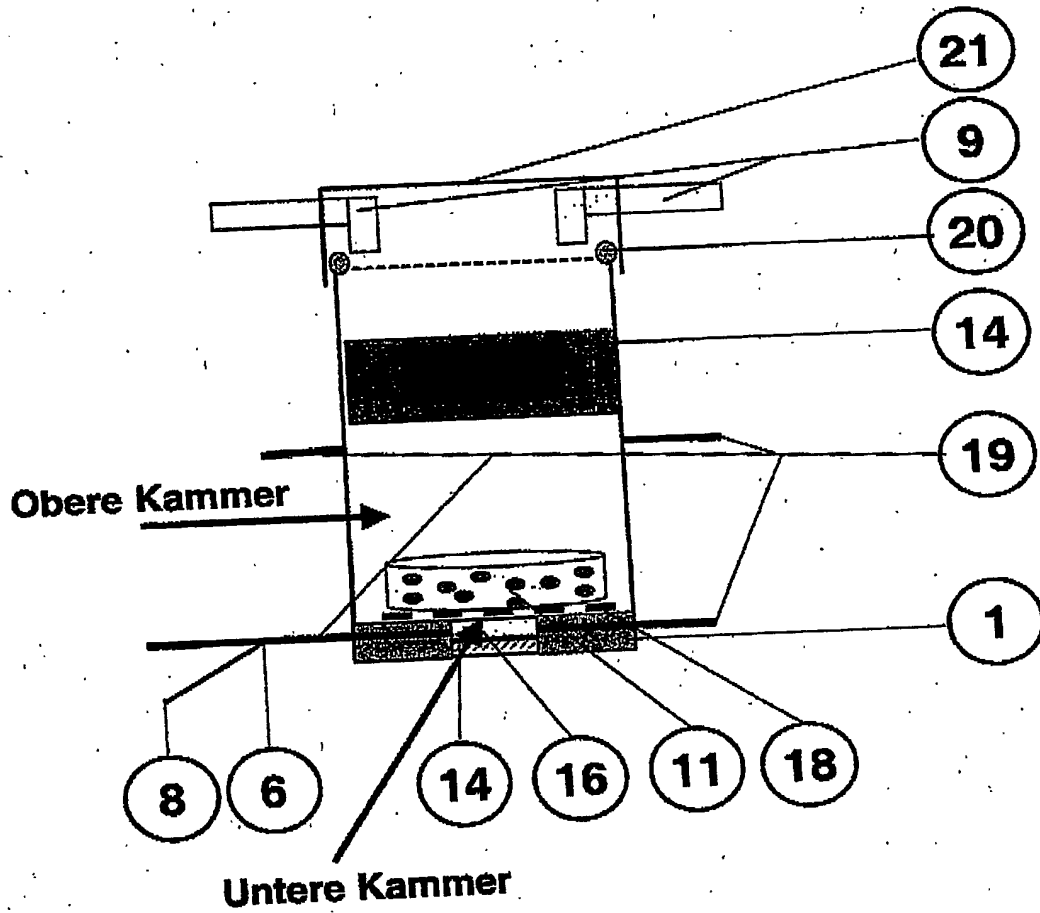


Fig. 5

Fig. 5a

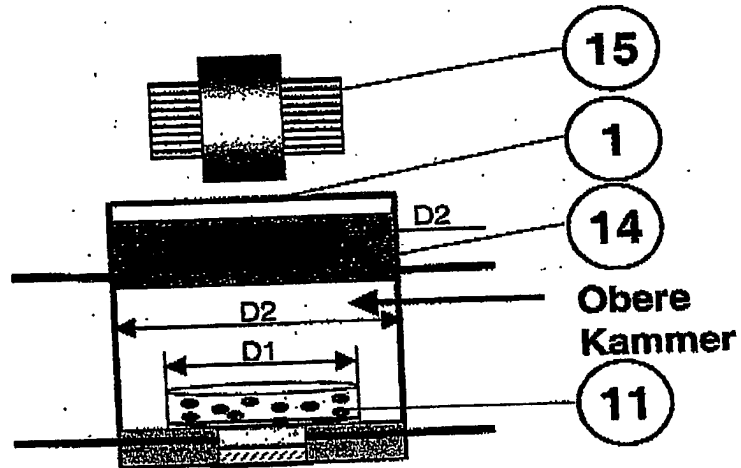


Fig. 5b

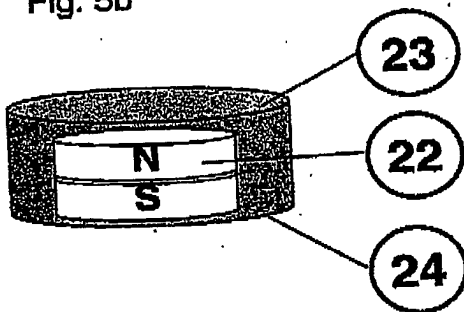


Fig. 5c

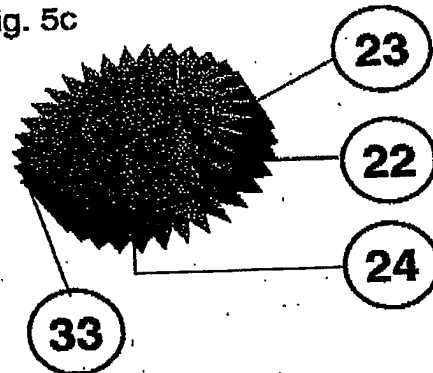


Fig. 5d

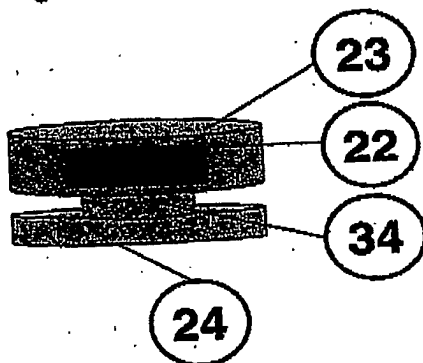
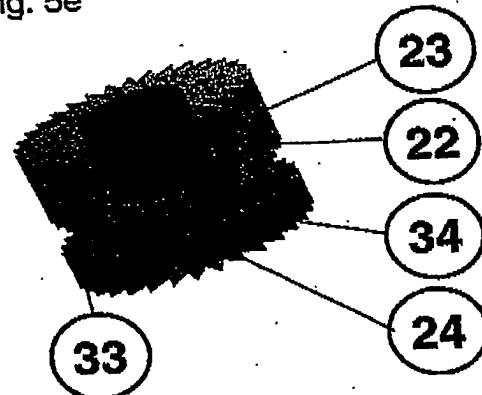


Fig. 5e



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 6

Fig. 6a

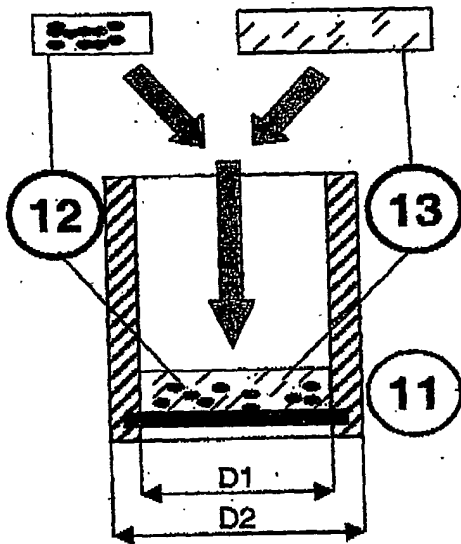


Fig. 6b

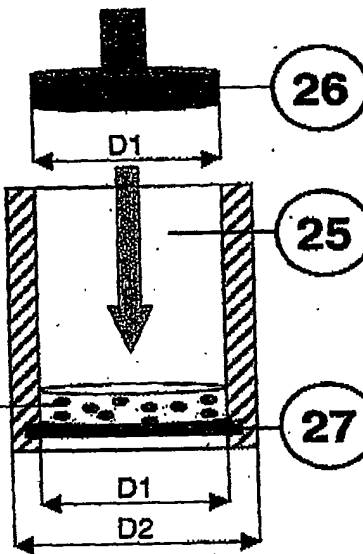


Fig. 6c

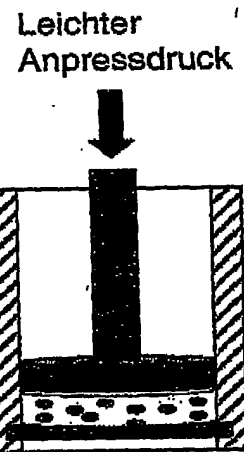


Fig. 6d

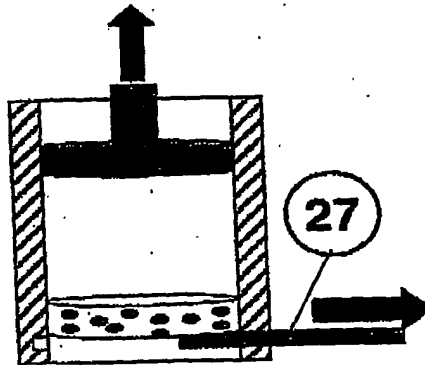


Fig. 6e

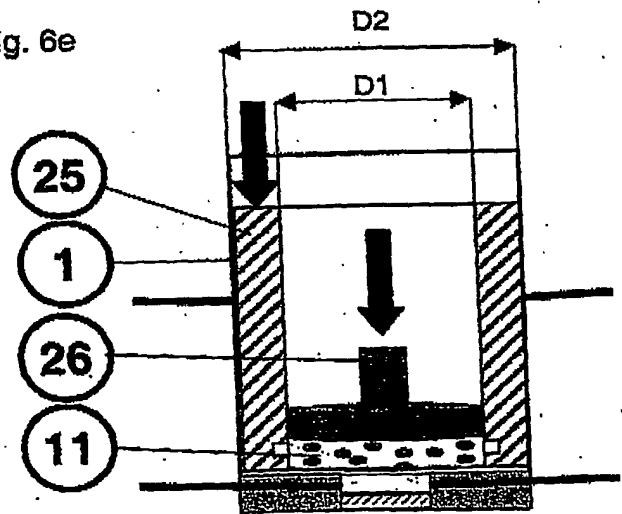


Fig. 7

Fig. 7a

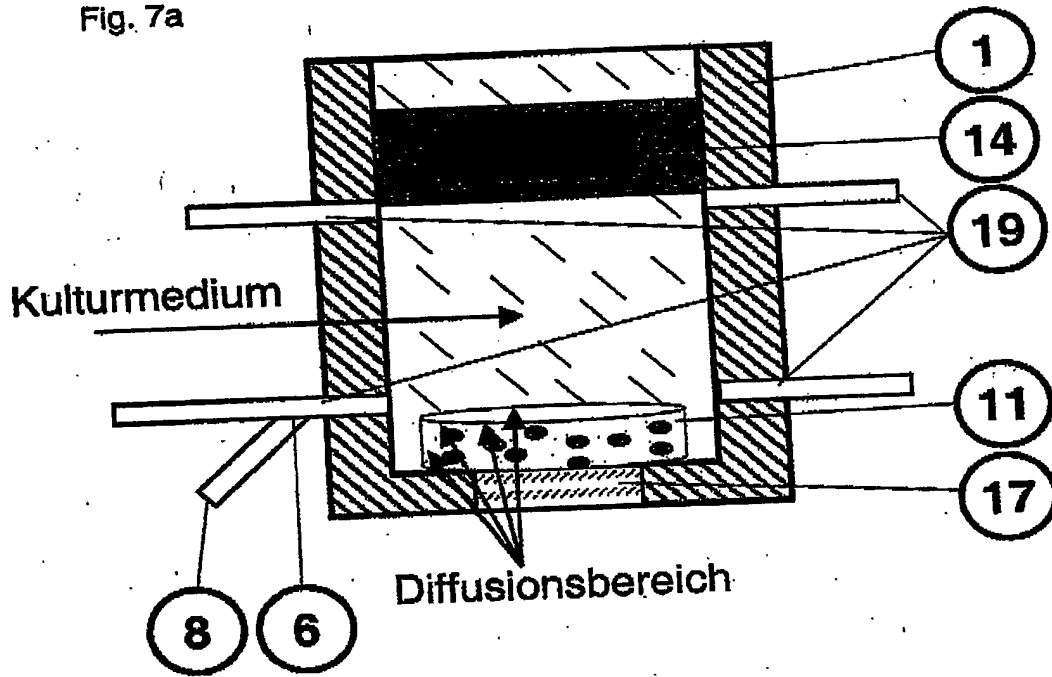


Fig. 7b

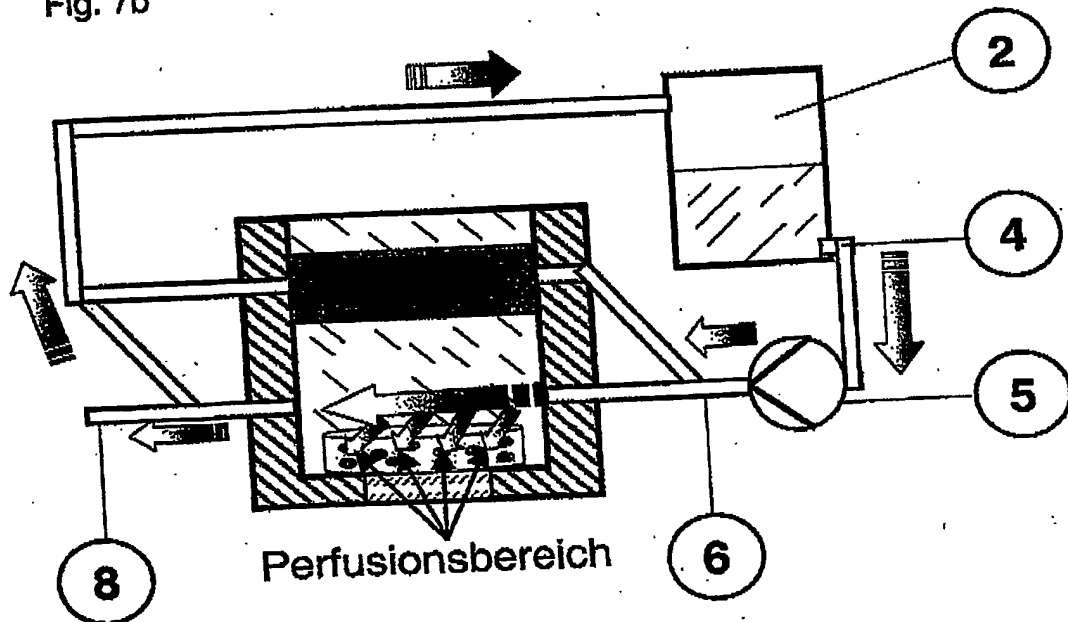


Fig. 8

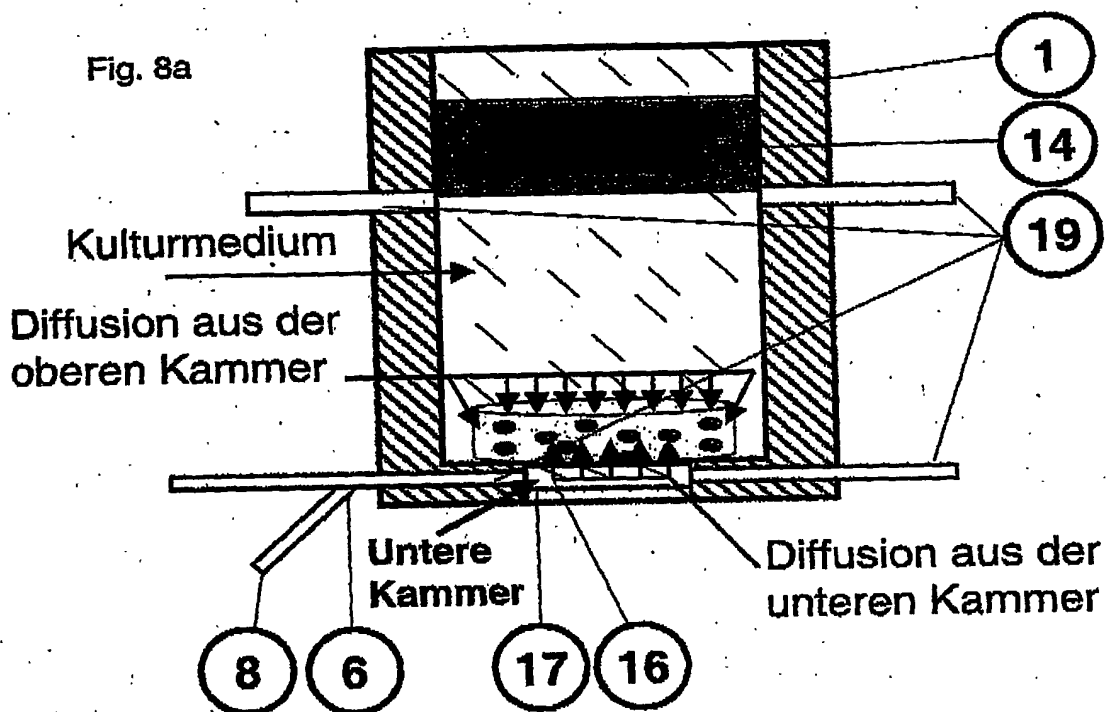


Fig. 8b

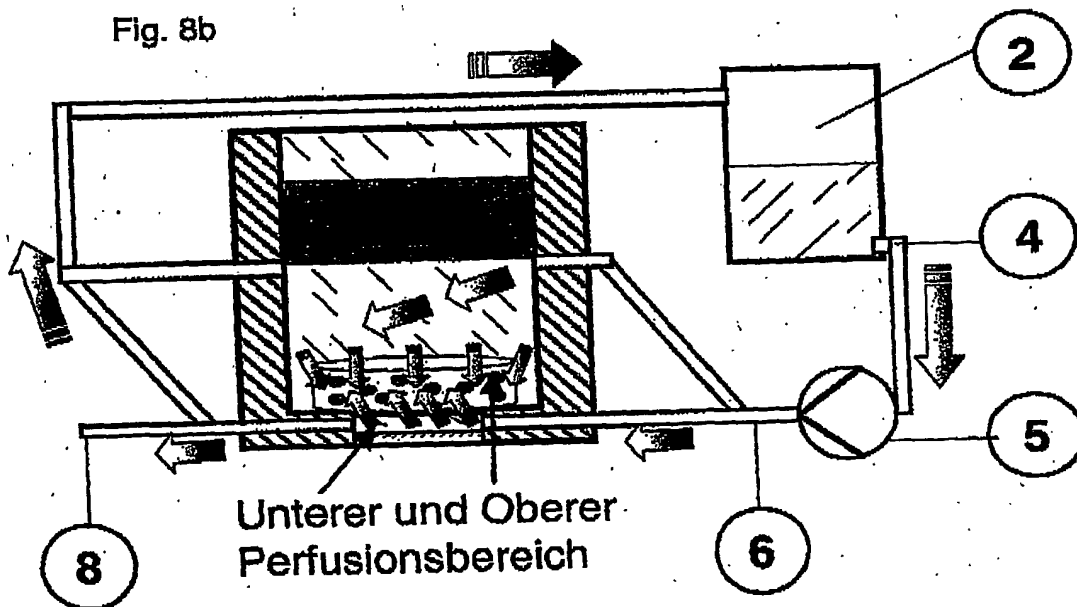


Fig. 9

Fig. 9a

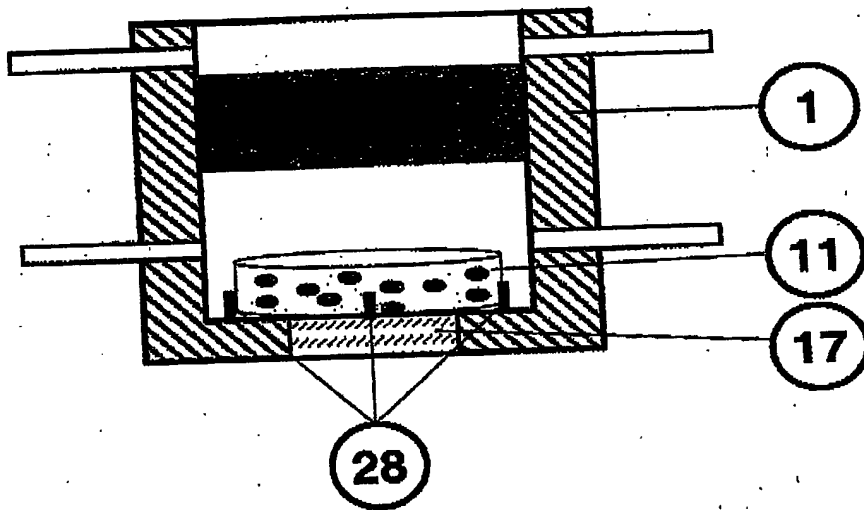


Fig. 9b

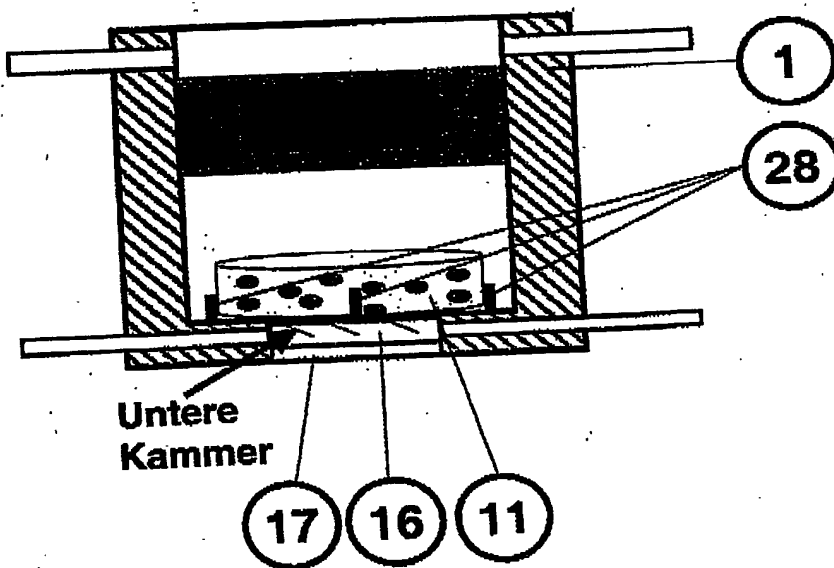


Fig. 10

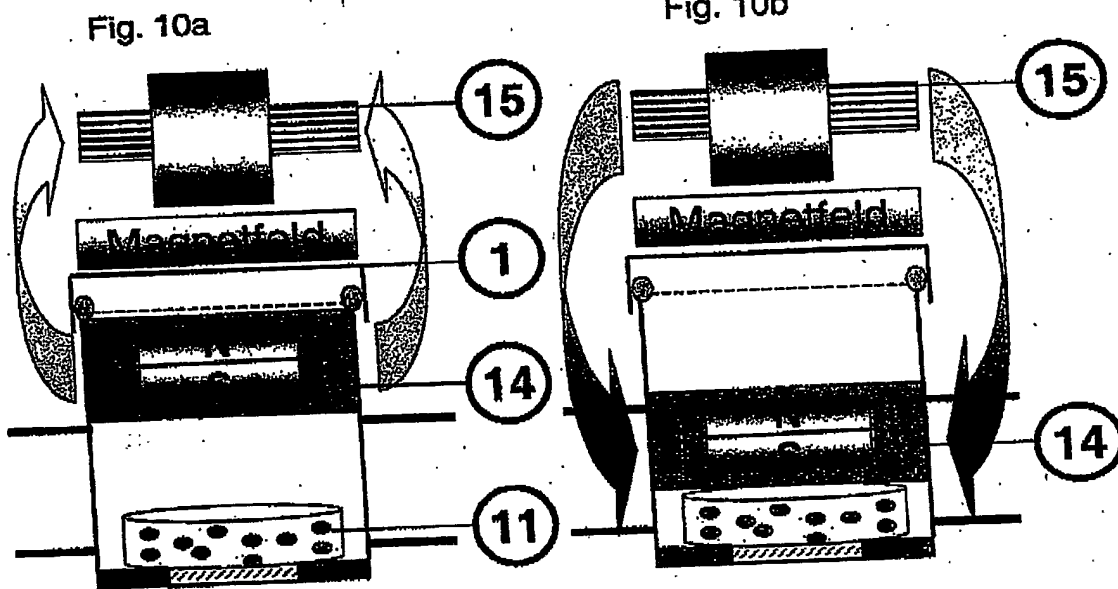
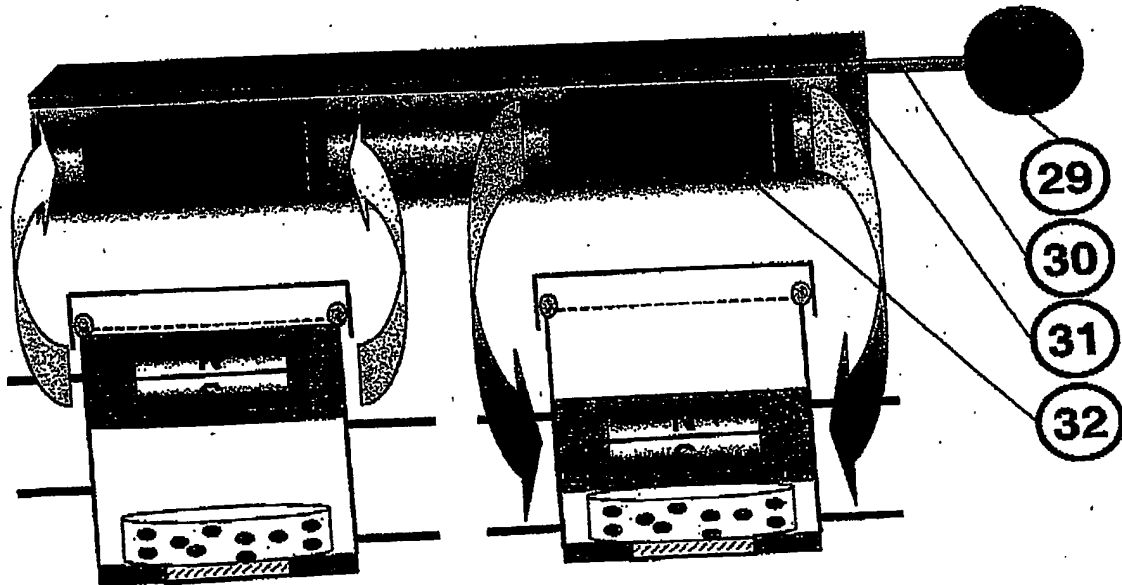


Fig. 10c



BEST AVAILABLE COPY



Fig. 10d

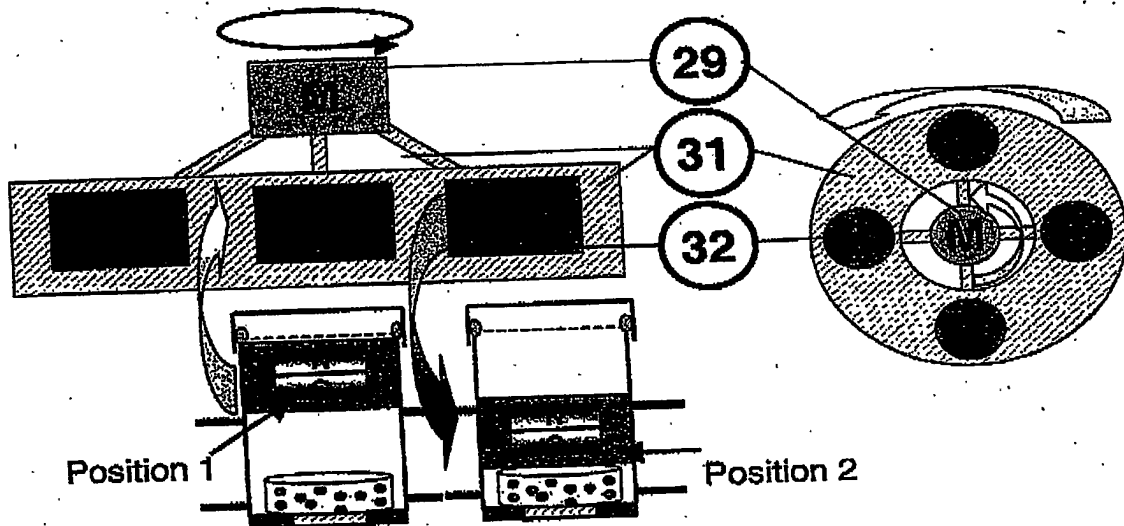
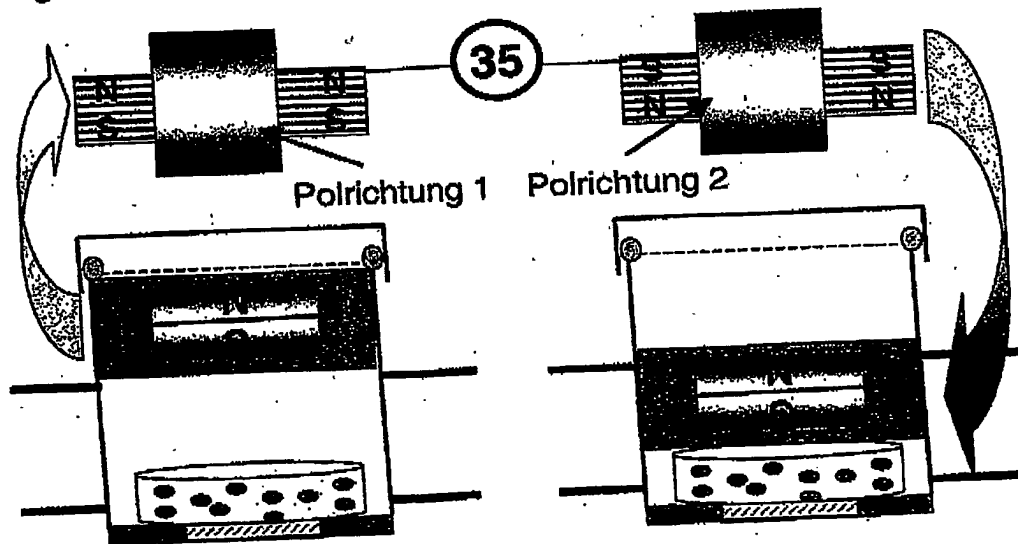


Fig. 10e



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 11

Fig. 11a

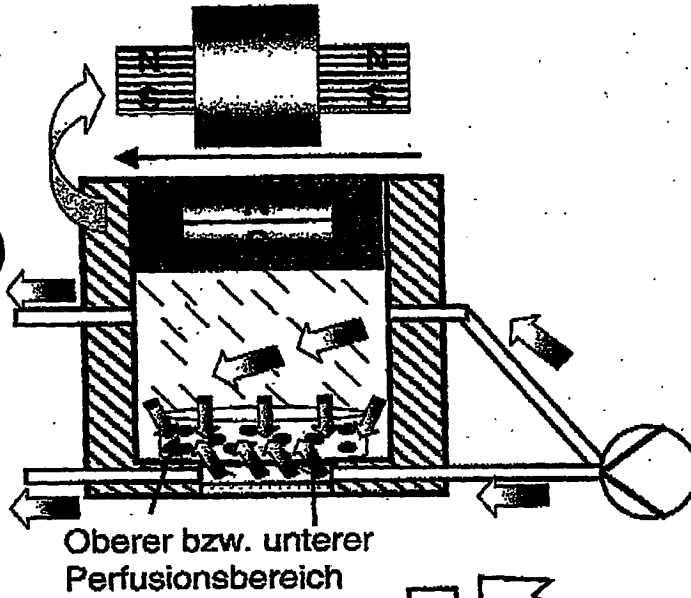


Fig. 11c

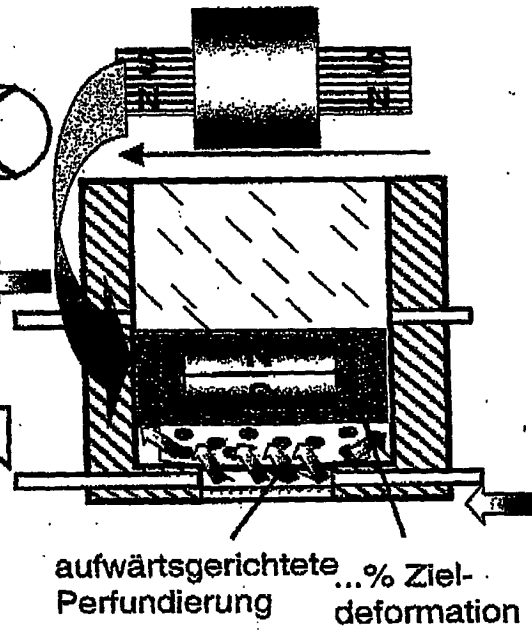


Fig. 11b

